

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

**Délivré par l'Université de Montpellier 2**

**Préparée au sein de l'école doctorale SIBAGHE  
Et de l'unité de recherche AGAP**

**Spécialité : Biologie Intégrative des Plantes**

**Présentée par Sophia HENRY**

**Etude de la fonction de deux facteurs de  
transcription *SHORT-ROOT 1* et *SHORT-  
ROOT 2* dans la mise en place du cortex  
chez le riz**

**Soutenue le 10 décembre 2015 devant le jury composé de**

M. Florian FRUGIER, DR2, CNRS  
M. Benoit MENAND, CR, CNRS  
M. Benjamin PERET, CR, CNRS  
M. Olivier PANAUD, PR, UPVD  
M. Pascal GANTET, PR, UM2  
M. Christophe PERIN, DR, CIRAD

Rapporteur  
Rapporteur  
Examinateur  
Examinateur  
Examinateur  
Directeur de thèse



# Résumé

Un développement racinaire optimal est essentiel pour favoriser la croissance des plantes et leur permettre d'accéder à de meilleurs rendements. La plupart de nos connaissances concernant le contrôle moléculaire du développement racinaire ont été acquises grâce à l'étude de la plante modèle dicotylédone *Arabidopsis thaliana*. Les racines de riz, plante modèle des monocotylédones, présentent une anatomie semblable à celle d'*A.thaliana*. Ces deux systèmes racinaires sont caractérisés par une organisation concentrique des tissus autour de la stèle. Entre l'endoderme et l'épiderme, le riz présente deux couches externes, appelées le sclérenchyme et l'exoderme, ainsi que plusieurs couches de cortex dans la zone centrale. Chacun de ces tissus possède des spécificités anatomiques et moléculaires qui leur confèrent des rôles diverses dans le développement et la croissance de la racine. Le nombre de couches de cortex varie en fonction du type de racines, du stade de développement de la plante et des conditions environnementales. Le tissu cortical a un rôle structurel, fonctionnel et adaptatif essentiel pour les racines de riz.

La différenciation du cortex et de l'endoderme a été longuement étudiée chez *A.thaliana* durant la dernière décennie. Le gène SHORT-ROOT (*SHR*) a été identifié comme un gène clé dans leurs formations. Un modèle moléculaire a été développé, où *SHR* est transcrit dans la stèle, la protéine migre jusque dans l'endoderme où elle active la transcription du gène SCARECROW (*SCR*). Ensemble *SHR* et *SCR* induisent la division périclinale asymétrique d'une cellule initiale, permettant la formation des deux couches de tissus internes que sont l'endoderme et le cortex. Chez le riz, il existe des orthologues de *SHR* et *SCR*, qui sont apparus suite à des duplications, appelés *OsSHR1* & *OsSHR2* et *OsSCR1* & *OsSCR2*. Au sein de cette thèse nous avons tenté d'identifier le rôle des gènes *OsSHR1&2* dans la mise en place des différentes couches de cortex chez le riz.

# Abstract

Optimal root development is central for plants to reach maximum growth and yield. Most of our knowledge regarding genes involved in root development has been accumulated in the dicotyledon model plant *Arabidopsis thaliana*. Roots of rice, the monocotyledon model, present several extra ground tissue layers compared to *A. thaliana*. Between epidermis and endodermis, rice possesses two outer cell layers, exodermis and sclerenchyma, and a multilayered cortex. All these tissues have specific cell identity, anatomical and molecular adaptations related to their diverse roles in root growth and function. Variation in the number of cortex cell layers depends on the rice root type and cortex is one of the key tissues for rice adaptation to submergence and tolerance to other environmental stresses.

Cortex and endodermis differentiation in *A. thaliana* has been extensively studied during the last 10 years. Thereby, SHORTROOT (SHR) gene in *Arabidopsis thaliana* has been identified as a key gene required for their formations. An elegant model was developed, where *SHR* is transcribed in stele tissue and its protein moves to the endodermis where it activates SCARECROW (SCR) transcription. Together, *SHR* and *SCR* induce periclinal division of the ground tissue initial separating cortex and endodermis cell layers. Cortex formation in rice represents an intriguing contrast to *A. thaliana*. Variations in the number of cortex cell layers can be observed between the root types and during rice development. There should be a control mechanism for the number of cortical cell layers, and *SCR* and *SHR* rice orthologs represent good candidates. Two duplications in rice led to apparition ortholog genes of *AtSHR* (*OsSHR<sub>1</sub>* and *OsSHR<sub>2</sub>*) and we have addressed the question of their respective function in cortex formation in rice root.



# Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Emmanuel Guiderdoni et Christophe Périn pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe DAR et de m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Un grand merci à Anne Dievart qui a co-dirigé ce travail. Je te remercie pour ta présence, tes conseils, ta confiance et ton humour, qui m'ont permis d'effectuer ce travail le plus sereinement possible.

Un grand merci à Fanchon Divol, qui m'a accompagnée, soutenue et guidée jusqu'à la fin de cette aventure.

Merci à tous les membres de l'équipe DAR : Aurore, Anne-Cécile, Martine, Mumu, Charlotte, Fabrice, Brigitte, Franz, Mathilde, Delphine, Donaldo et Julie qui ont participé de près ou de loin à cette thèse. Merci pour votre soutien, vos conseils, votre bonne humeur et ces bons moments partagés. Merci à toi aussi Bastien, et merci aux serristes d'avoir pris soin de mes plantes durant ces trois ans. Merci aussi à Nathalie Pivot, pour son aide dans toutes les démarches administratives.

Je tiens aussi à remercier vivement les rapporteurs d'avoir trouvé le temps de lire ce manuscrit ainsi que tous les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Merci à Geneviève Cojonero et Jean-luc Verdeil pour leurs conseils en histologie, merci à Gaétan Droc pour son aide lors des analyses transcriptomiques.

Merci aux colocs pour tous ces bons moments partagés au quotidien, tout au long de la thèse et particulièrement ceux de ces dernières semaines.

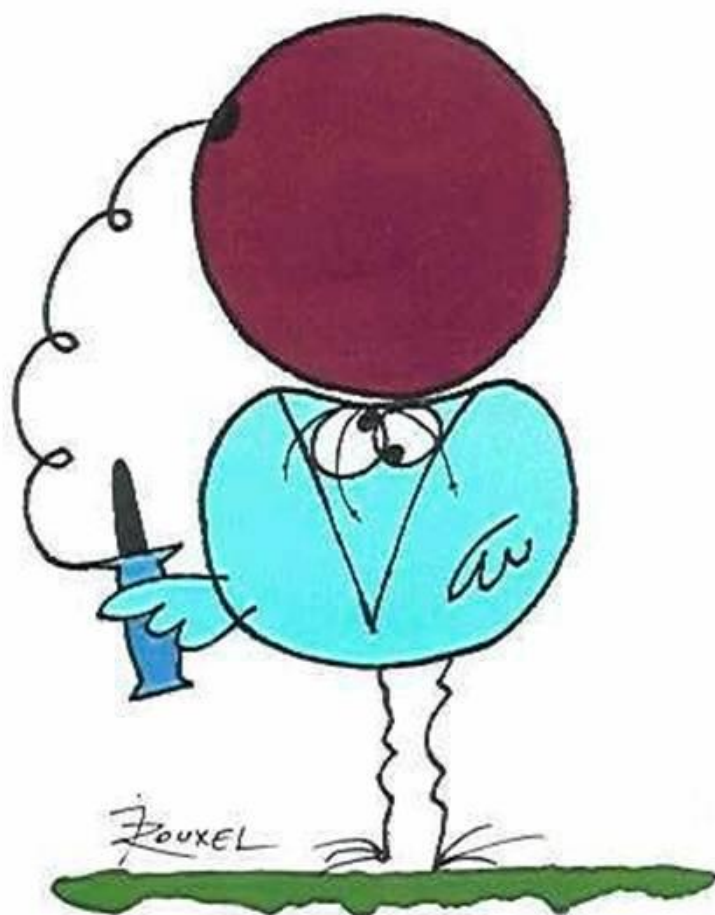
Un grand merci à Nina, Noem, Alessio, Yan, Rémi, Cacarole, Momo, Chonchon, Mel et tous les copains pour votre soutien, pour tous ces bons moments qui m'ont permis de me changer les idées durant ces trois ans. Sans vous, la thèse n'aurait pas été la même.

Je tiens aussi à remercier vivement ma famille pour sa présence malgré la distance ; merci de m'avoir accompagnée jusqu'au bout, et merci à toi papa pour tes corrections minutieuses.

Jerem, merci pour ta présence, ta patience, et ton soutien sans faille.



## Les devises Shadok



EN ESSAYANT CONTINUUELLEMENT  
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:  
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A  
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.



# Sommaire

Liste des Abréviations .....	1
<b>Introduction Générale</b> .....	7
<b>I. Systèmes racinaires</b> .....	13
I.1 Définition d'un système racinaire .....	13
I.2 Comparaison des systèmes racinaires du riz et d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	13
I.3 Mise place des systèmes racinaires .....	15
<b>II. Le Cortex</b> .....	17
II.1 Origine et évolution du cortex .....	17
II.2 L'inner-cortex et sa régulation .....	19
II.3 Variation du nombre de couches de cortex selon les types racinaires .....	21
<b>III. Contrôle de la mise en place des tissus internes chez <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	23
III.1 <i>AtSHR</i> et <i>AtSCR</i> : deux gènes clefs impliqués dans la formation du cortex chez <i>A.thaliana</i> .....	23
III.2 Modèle moléculaire de la mise en place des tissus internes .....	23
<b>IV. Orthologues à <i>AtSHR</i></b> .....	29
IV.1 Conservation et évolution des protéines SHR .....	29
IV.2 Les orthologues du riz .....	31
<b>V. Problématique de la thèse</b> .....	33
<b>CHAPITRE I : Formation et identité cellulaire du cortex</b> .....	37
<b>Introduction</b> .....	39
<b>I. Caractérisation des deux types de cortex</b> .....	43
I.1 Différences anatomiques entre l'endoderme et le cortex .....	43
I.2 Origine de la couche d'inner-cortex .....	43
<b>II. L'inner et l'outer cortex présentent des signatures moléculaires distinctes</b> .....	47
<b>III. Le cortex dans les racines latérales : présence d'outer-cortex et absence d'inner-cortex</b> .....	49
III.1 Différences anatomiques entre les 3 types de racines latérales .....	51
III.2 Identification des tissus internes dans les différents types de racines latérales .....	51
<b>Conclusion</b> .....	55
<b>CHAPITRE II : Mécanismes moléculaires de la mise en place du cortex</b> .....	59
<b>Introduction</b> .....	61

<b>I. La surexpression des gènes <i>SHR</i> engendre la formation de couches surnuméraires de cortex .....</b>	<b>63</b>
<b>I.1. Phénotypage des lignées transgéniques .....</b>	<b>63</b>
<b>I.2 Corrélation entre phénotype et niveau d'expression des gènes <i>SHR</i> dans la plante ..</b>	<b>79</b>
<b>I.3 Régulation des <i>SHR</i> et réseau de gènes .....</b>	<b>87</b>
<b>Conclusion : un rôle commun des gènes <i>SHR</i> dans la mise en place du cortex racinaire, mais via des mécanismes distincts .....</b>	<b>95</b>
<b>II. Analyse de la mobilité des protéines SHR1, SHR2 et AtSHR dans le riz.....</b>	<b>99</b>
<b>II.1 Etude de la localisation des transcrits SHR.....</b>	<b>101</b>
<b>II.2 Analyses des fusions traductionnelles chez le riz.....</b>	<b>101</b>
<b>Conclusion : la protéine SHR2 plus mobile que SHR1 ? .....</b>	<b>107</b>
<b>III. Création de mutants perte de fonction .....</b>	<b>109</b>
Introduction.....	109
II. 1 Criblage d'une population TILLING.....	109
III. 2 Lignées transgéniques perte de fonction (Knock-down et Knock-out).....	125
<b>IV. Conclusion générale : Rôles des gènes <i>SHR</i> dans la mise en place du cortex .....</b>	<b>143</b>
<b>CHAPITRE III : Etude de l'expression d'<i>OsSHR1</i> dans le développement du cal et de la plante .....</b>	<b>147</b>
Introduction.....	149
<b>I. Etude de l'expression d'<i>OsSHR1</i> au cours du développement de la plante .....</b>	<b>153</b>
I.1 <i>OsSHR1</i> est exprimé dès la germination .....	153
I.2 Profil d'expression d' <i>OsSHR1</i> en réponse à différents signaux environnementaux.....	155
I.3 Conclusion : <i>OsSHR1</i> a une expression stable au cours du temps.....	155
<b>II. Etude de l'expression d'<i>OsSHR1</i> au cours de la callogénèse et de la régénération .....</b>	<b>161</b>
II.1 Profil d'expression d' <i>OsSHR1</i> sur le milieu d'induction .....	161
II.2 Profil d'expression d' <i>OsSHR1</i> sur le milieu de régénération .....	163
II.3 Conclusion : rôles d' <i>OsSHR1</i> durant la callogénèse et la régénération .....	165
<b>III. Etude de la régénération des plantes transgéniques <i>OsSHR1</i> .....</b>	<b>169</b>
<b>IV. Conclusion générale : rôle de <i>SHR1</i> dans la callogénèse .....</b>	<b>175</b>
<b>Discussion et Perspectives.....</b>	<b>179</b>
Le cortex du riz présente des propriétés communes avec celui d' <i>A.thaliana</i> .....	183
<i>SHR1</i> et <i>SHR2</i> interviennent dans la mise en place du cortex .....	185
Perspectives à plus longs termes .....	189
<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>195</b>
<b>Matériels .....</b>	<b>196</b>
Kits .....	196

Matériel végétal .....	196
<b>Méthodes .....</b>	<b>197</b>
Extraction des acides nucléiques .....	197
Analyses protéiques .....	200
Colorations .....	202
Clonages .....	203
Transformation du riz.....	203
Test antibiotique .....	204
Phénotypage racinaire des lignées TILLING .....	205
<b>Milieus de culture, solutions, tampons.....</b>	<b>206</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>20713</b>
<b>Publications .....</b>	<b>207</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>





## Liste des Abréviations

°C :	Degré Celsius
AIA :	Acide Indole acétique
ABA:	Acide Abscissique
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADNc:	ADN complémentaire
ADNg:	ADN génomique
ANOVA :	Analyse de variance
ARF :	AUXIN RESPONSE FACTOR
ARN:	Acide ribonucléique
ARNm:	ARN messenger
AP2:	<i>APETALA 2</i>
BAP:	6-benzylaminopurine
BR:	Brassinostéroïdes
CAM :	Métabolisme Acide C rassulacéen
CEEI:	Common Epidermis Endodermis Initial
CEI:	Cortex Endodermis Initial
CEID:	Cortex Endodermis Initial Daughter
Cf.:	Confère
CI:	Cortex initials
CIM:	Callus Induction Media
CIRAD:	Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
cm, mm, µm, nm:	centimètre, millimètre, micromètre, nanomètre
CRISPR/Cas:	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR Associated Protein
crRNA:	CRISPR ARN
Ct:	Cycle threshold
CT:	Coupe transversal
DNase:	Désoxyribonucléase
EI:	Endodermis Initials
EREBP :	<i>ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEINS</i>
FAO:	Food Agriculture Organization
FASGA:	Formaldéhyde, safranine, glycérine, acide acétique
FT:	Facteurs de transcription
g, mg, µg:	gramme, milligramme, microgramme
GA:	Gibberellin
GFP:	Green fluorescent protein

GRAS:	GIBBERELIC ACID INSENSITIVE, REPRESSOR of GAI, SCARECROW
GT:	Ground Tissue
GUS:	$\beta$ -glucuronidase
h, min:	heure, minute
HAM:	HAIRY MERISTEM
HD ZIP III:	<i>HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER III</i>
Kb:	Kilo-base
KD:	Knock-down
kDa:	kiloDalton
KO:	Knock-out
IC:	Inner-cortex
IRRI:	International Rice Research Institute
l, cl, ml:	litre, centiliter, millilitre
LHR:	Leucine Heptad Repeat
LR, L-LLR, T-LLR, SLR:	Lateral Root, Large Large Lateral Root, Thin Large Lateral Root, Small Lateral Root
LRP:	Lateral Root Primordium
LS :	LATERAL SUPPRESSOR
M, mM, $\mu$ M:	Molaire, millimolaire, micromolaire
Ma:	millions d'années
MC:	Middle-Cortex
miARN:	micro ARN
MS:	Murashige and Skoog
MRI:	Montpellier RIO Imaging
MYB :	<i>Myeoblastosis</i>
NB:	<i>Nipponbare</i>
NDAIC:	Nombre de Divisions Anticlinales de l'Inner-Cortex
NCE:	Nombre de Cellules d'Endoderme
NCIC:	Nombre de Cellules d'Inner-Cortex
NPA :	Acide Naphthylphthalamique
NPE:	Nombre de Divisions Périclinales des cellules d'Endoderme
OC:	Outer-cortex
OE :	Overexpressed Lines
PAC:	Paclobutrazol
PAT1:	PHYTOCHROME A SIGNAL TRANSDUCTION
pb:	Paire de bases
PCR:	Polymerase Chain Reaction
pH:	Potentiel Hydrogène
PHIV :	Plateforme d'Histologie et d'Imagerie cellulaire Végétale
PLT:	PLETHORA
p-value:	valeur de probabilité

QC:	Centre Quiescent
Q-PCR:	Quantitative PCR
RAM:	Root Apical Meristem
RNA:	Ribonucleic acid
RNAi:	ARN interference
RT-PCR:	Reverse transcription PCR
SCR:	SCARECROW
SHR :	SHORT-ROOT
SIM :	Shoot Induction Media
SN :	Ségrégant Nul
SR:	Seminal Roots
TALEN:	Transcription Activator-like Effector Nuclease
T-DNA:	Transfert DNA
TARGET:	Transient Assay Reporting Genome-wide Effects of Transcription factors
TILLING:	Targeting Induced Local Lesions in Genomes
trcrRNA:	trans-activating RNA
UTR:	Untranslated Region
UV:	Ultra-violets
WT:	Wild Type
YFP:	Yellow fluorescent protein



# **Introduction**

## **&**

# **Etat de l'art**



## Introduction Générale

Le riz (*Oryza sativa*) est l'une des principales cultures vivrières de la planète. Cette céréale de la famille des Poacées (anciennement Graminées) est la base de l'alimentation de plus de la moitié de la population mondiale, soit environ 3.5 milliards de personnes. Cette plante monocotylédone est cultivée dans différentes régions du globe, en particulier en Asie, où se concentrent 90% des surfaces. La maîtrise des apports en eau constitue le principal problème auquel doit faire face la riziculture pour maintenir, voire augmenter la production (Kawata S 1965). En tant que culture vivrière majeure, sa production entre dans la problématique de sécurité alimentaire mondiale. En effet, la population mondiale est en constante augmentation, avec une prévision d'un milliard de personnes supplémentaires d'ici 2020. Cette croissance démographique s'accompagne d'une augmentation de la consommation alimentaire, estimée à plus de 50 % d'ici 5 ans. Pour répondre à ces besoins il s'avère nécessaire d'augmenter les productions céréalières. Selon la FAO (Food and Agriculture Organization), la production mondiale de riz en 2009 était de 685 millions de tonnes et a été estimée à 730 millions de tonnes pour l'année 2012. La consommation mondiale de riz augmente chaque année ; en effet, le passage de l'année 2011 à 2012 a nécessité une hausse de production de 7,4 millions de tonnes. Cela signifie que dans 10 ans le monde devra produire 50 millions de tonnes de riz de plus qu'il n'en produit aujourd'hui. Il est donc primordial d'apporter de nouvelles solutions aux sélectionneurs, dans le but de créer des variétés mieux adaptées aux contraintes environnementales, et à anticiper les conséquences du changement climatique en cours sur les rendements. Une solution possible serait d'augmenter la proportion de surfaces cultivables en optimisant le développement du riz dans des conditions limitantes.

La séquence complète du génome du riz a été publiée en 2005 (Katsiarimpa, Kalinowska et al. 2013) conférant à cette plante un statut de plante modèle. Son génome compact s'organise en 12 chromosomes sur lesquels se répartissent entre 35 000 et 40 000 gènes. La séquence annotée du génome du riz, associée à l'existence de nombreuses collections de mutants, a ouvert les portes de la génomique fonctionnelle chez cette espèce (Krishnan, Guiderdoni et al. 2009). Ces outils ont permis d'accélérer les études de gènes d'intérêts agronomiques intervenant dans la physiologie de la plante, la productivité et la qualité de la récolte, la défense des bio-agresseurs et dans l'adaptation des plantes à des conditions environnementales changeantes, notamment en réponse au stress hydrique. Toutes ces études sont menées dans l'optique de répondre aux défis agronomiques de la riziculture actuelle. Depuis la domestication des plantes cultivées il y a 10 000 ans jusqu'au XX<sup>ème</sup> siècle, les agriculteurs pratiquaient la sélection massale. Cette sélection consistait à prélever les graines des plantes les plus vigoureuses et de les semer pour la culture suivante. C'est au cours de la révolution verte apparue dans les années 50 que d'énormes progrès ont été réalisés dans le domaine de la sélection des plantes cultivées (Courtois 2007). La création de l'International Rice Research Institute (IRRI) en 1959 a concentré les efforts pour améliorer les variétés de riz. Ainsi de nombreux nouveaux critères de sélection sont apparus,





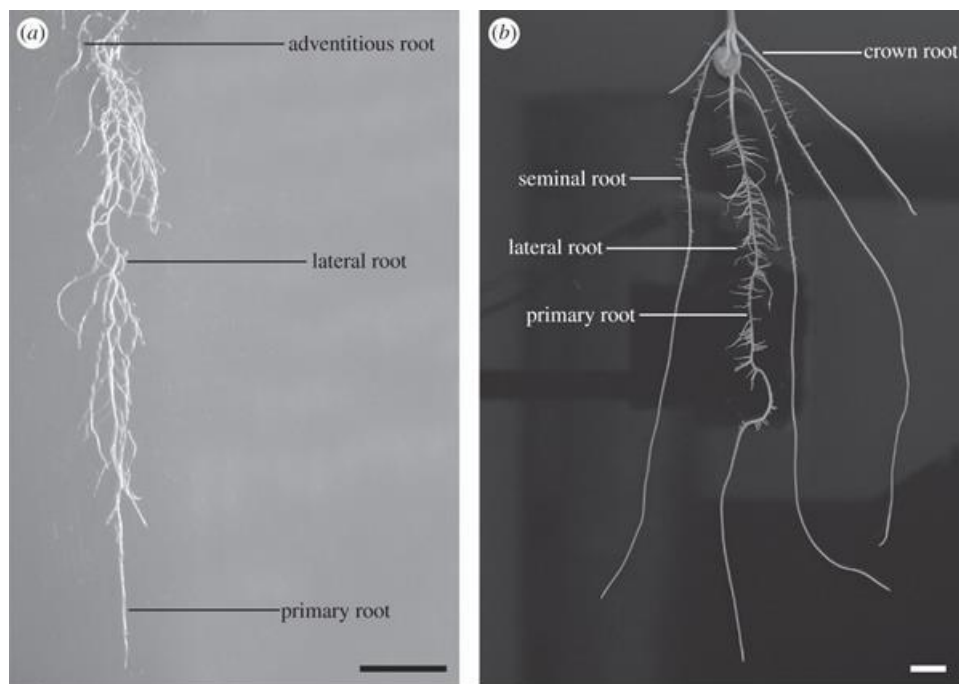
avec dans un premier temps l'apparition des variétés semi-naines, dont la taille réduite permettait de limiter la verse et d'augmenter le rendement. Puis sont apparus des critères basés sur des propriétés de la plante telle que la qualité du grain, la précocité de la plante et les résistances aux maladies. Ces critères permirent d'obtenir des variétés hyper-productives avec des cycles de développement plus courts et donc d'envisager plusieurs récoltes par an dans les environnements les plus propices. Ce n'est que dans les années 1990 que la notion d'idéotype prit forme (Cassman 1993), et le système racinaire devint alors un élément clé dans les schémas de sélections. En effet, le système racinaire, en plus de sa fonction d'ancrage dans le sol, permet l'accès aux ressources hydrominérales présentes (Gregory 2006). De plus, il est aujourd'hui bien établi que l'architecture racinaire est un paramètre clé de la tolérance aux stress abiotiques (Price, Steele et al. 2002; Tuberosa, Sanguineti et al. 2002). Ainsi, une meilleure connaissance du contrôle moléculaire du développement et de la plasticité adaptative de l'appareil racinaire permettrait aux sélectionneurs de construire de nouvelles variétés mieux adaptées aux besoins, par la technique de sélection assistée par marqueurs. Une part importante des adaptations réussies résulte d'adaptations morphologiques et anatomiques, en particulier au niveau des tissus internes de la racine. Malheureusement, il existe peu de données moléculaires disponibles permettant d'envisager la conception d'idéotypes racinaires adaptés à des conditions de stress variées. C'est au cœur de cette problématique que travaille l'équipe DAR (Développement Adaptatif du Riz) de l'UMR AGAP (Génétique et Adaptation des Plantes tropicales et méditerranéennes) du CIRAD (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) de Montpellier, au sein de laquelle j'ai effectué ma thèse. L'un des sujets sur lesquels se focalise l'équipe est l'étude des mécanismes du développement de l'appareil racinaire du riz, et plus précisément l'étude de la mise en place de ses tissus internes.

Mon travail de thèse s'inscrit dans un axe de recherche dont le but est d'étudier le contrôle moléculaire de la différenciation des tissus internes dans la racine de riz. Mon sujet est axé sur le tissu cortical et cherche à répondre aux questions suivantes : Quelle est son organisation ? Quelles sont ses particularités ? Comment sa mise en place est-elle régulée ?

Chez *Arabidopsis thaliana*, deux gènes codant des facteurs de transcription de la famille GRAS, appelés SCRARECROW (*AtSCR*) et SHORTROOT (*AtSHR*) ont été identifiés comme des acteurs clés dans la mise en place de ces tissus. Nous nous sommes donc penchés sur l'étude fonctionnelle des orthologues putatifs d'*AtSHR* nommés *OsSHR1* et *OsSHR2*. Au cours de ce travail de thèse, nous avons donc voulu savoir quel était le rôle de ces facteurs de transcription (FT) dans la mise en place des tissus racinaires, et si leurs fonctions étaient similaires à celle d'*AtSHR* chez *A.thaliana*? L'objectif final étant de développer un modèle moléculaire du fonctionnement de ces gènes dans la mise en place du cortex. Pour répondre à cette problématique, plusieurs axes d'études ont été menés au cours de ces trois années de thèse. Les données obtenues sont présentées dans ce manuscrit qui est organisé en trois parties majeures. Après une synthèse bibliographique sur le cortex



et le rôle de gènes clés impliqués dans sa mise en place, une synthèse du travail réalisé autour de l'organisation du tissu cortical chez le riz sera présentée. Dans un second temps, nous présenterons les résultats obtenus concernant le rôle des gènes *OsSHR1* et *OsSHR2* dans la mise en place de ce tissu, qui nous ont permis de proposer un modèle moléculaire de leur fonctionnement. La troisième partie de ce manuscrit traitera d'une analyse plus approfondie du facteur de transcription *OsSHR1*, qui semble également être impliqué dans la callogénèse.



**Figure 1 : Systèmes racinaires pivotant et fasciculé** (Smith and De Smet 2012). Barres = 1cm

(a) Système racinaire pivotant d'*Arabidopsis thaliana*

(b) Système racinaire fasciculé du maïs

## I. Systèmes racinaires

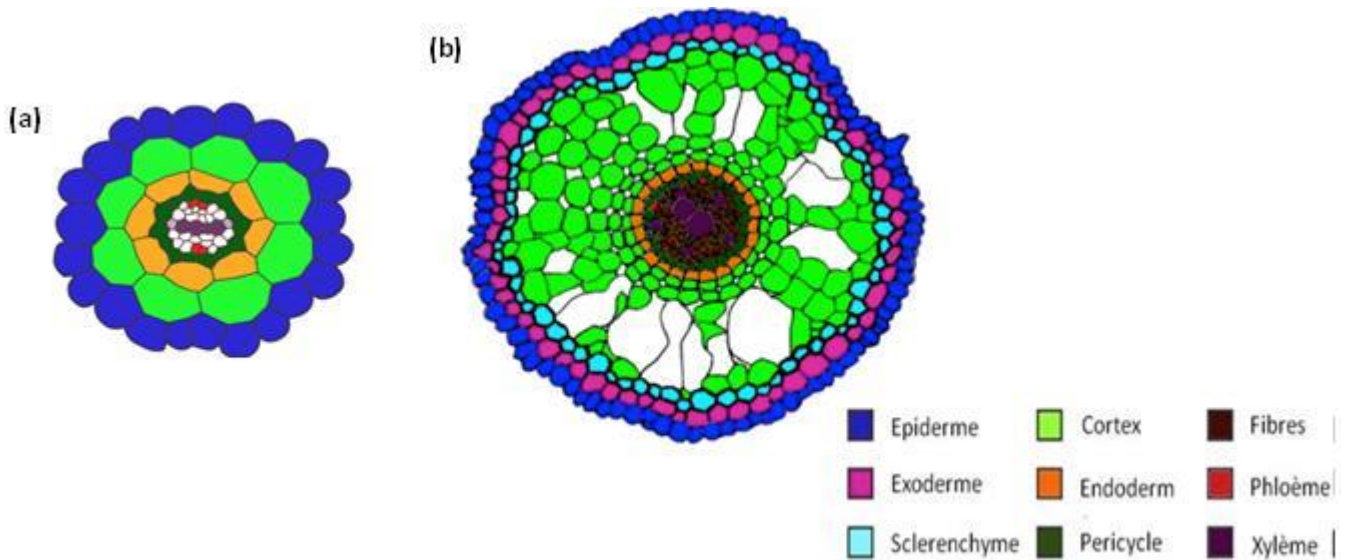
### I.1 Définition d'un système racinaire

Le système racinaire est une composante anatomique fondamentale des végétaux supérieurs. Il regroupe différents types de racines qui sont les organes souterrains permettant à la plante de puiser les ressources dans le sol, telles que l'eau et les minéraux (Gregory 2006; Mai, Phung et al. 2014). En effet les racines ont pour rôle de prélever des substances vitales dans le sol, telles que eau, sels minéraux et nutriments, afin d'alimenter les cellules de la plantes. Le système racinaire est également nécessaire à la stabilité de la plante. Grâce à son ancrage dans le sol, il assure le port dressé de la plante (Nawy, Lee et al. 2005). En plus de ses rôles d'absorption des nutriments et de fixation de la plante, la racine est aussi un organe de réserve. Ces racines sont organisées selon une architecture complexe dépendant de plusieurs paramètres, tels que leur morphologie, leur anatomie, leur distribution hiérarchique et leur arrangement spatial (Jung and McCouch 2013; Ristova, Rosas et al. 2013).

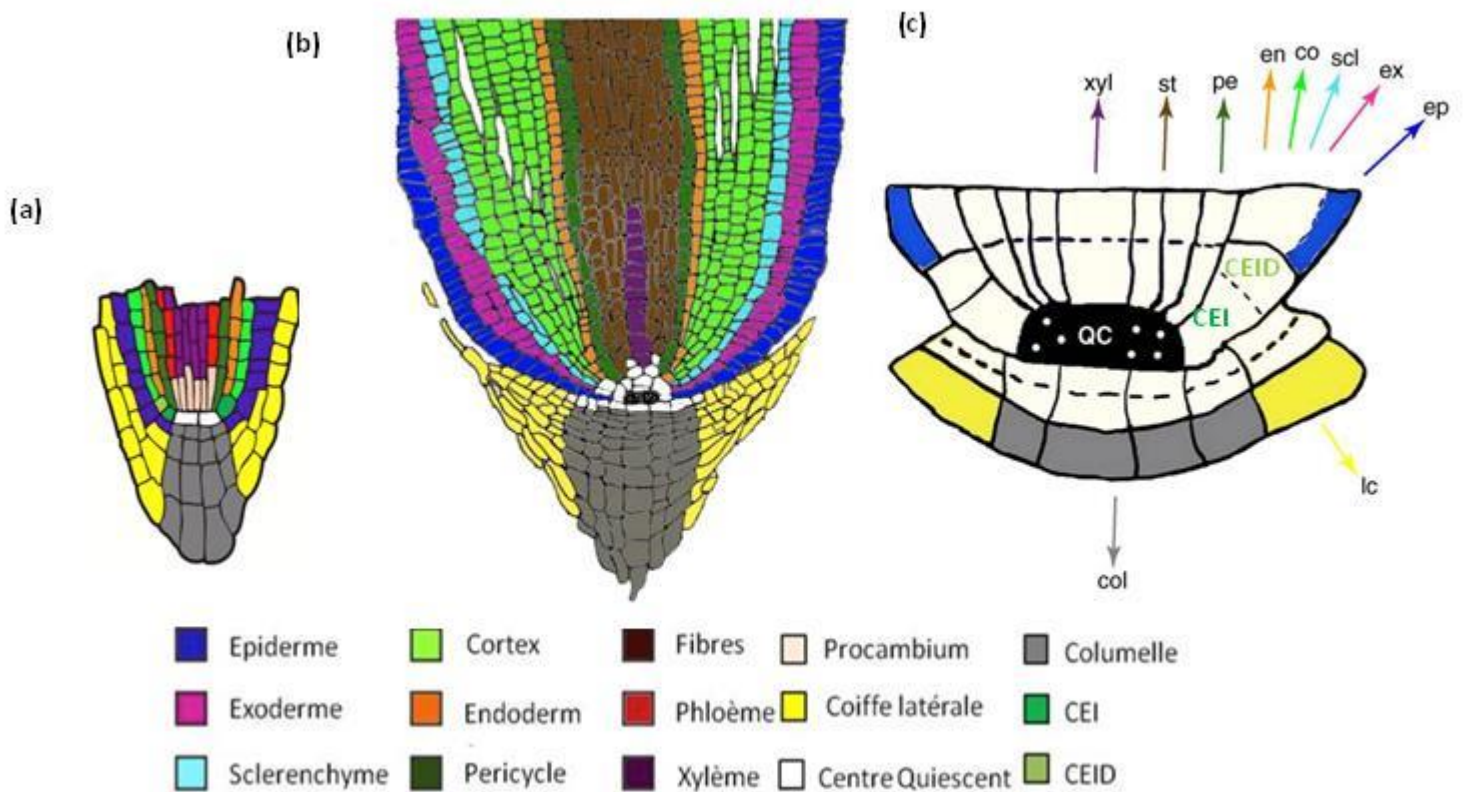
Il existe deux principaux types de systèmes racinaires: le système racinaire pivotant et le système racinaire fasciculé. Le système pivotant se retrouve principalement chez les Dicotylédones et les Gymnospermes. Il se caractérise par une racine principale à gravitropisme positif sur laquelle se développent des racines latérales. Il est caractéristique de la carotte ou de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (**Figure 1 a**). Le système fasciculé, retrouvé chez presque toutes les monocotylédones (comme le riz et le maïs), se caractérise par la présence d'un grand nombre de racines. Une première racine émerge durant le stade embryonnaire (racine primaire, radicule ou racine séminale) puis est remplacé au cours du développement de la plante par des racines coronaires (appelées aussi adventives). Les racines séminales et coronaires peuvent se ramifier et produire des racines latérales, ce qui permet d'augmenter la surface d'exploration du sol (Smith and De Smet 2012) (**Figure 1 b**). Les racines coronaires et latérales, qui sont des racines post-embryonnaires, ont un mécanisme de formation qui leur sont propre et qui diffère de celui de la séminale (Orman-Ligeza, Parizot et al. 2013). De nombreuses études sont menées pour identifier les réseaux de gènes impliqués dans la formation du système racinaire et comprendre les voies de signalisations activées (Jung and McCouch 2013; Mai, Phung et al. 2014). Cependant les connaissances sont encore limitées et de nombreuses choses restent encore à découvrir.

### I.2 Comparaison des systèmes racinaires du riz et d'*Arabidopsis thaliana*

Ces racines sont caractérisées par une organisation commune. Elles sont constituées de trois grands groupes de tissus : l'épiderme, les tissus internes et les tissus vasculaires (Gregory 2006). Les faisceaux vasculaires (xylème et phloème) sont situés dans la stèle, au centre de la racine. Les autres tissus s'organisent autour d'eux de façon concentrique. L'épiderme est la couche la plus externe dont le rôle est de protéger la racine. Avec ses poils



**Figure 2: Anatomie racinaire comparée entre *A.thaliana* et le riz.** Comparaison de l'organisation radiales des tissus racinaires entre *A. thaliana* (a) et Riz (b). (Nakajima, Sena et al. 2001; Rebouillat, Dievart et al. 2009)



**Figure 3: Anatomie racinaire comparée entre *Arabidopsis thaliana* et le riz.** (Nakajima, Sena et al. 2001; Rebouillat, Dievart et al. 2009)

(a) Mise en place des tissus internes au niveau du RAM chez *A. thaliana*.

(b) Mise en place des tissus internes au niveau du RAM chez le Riz.

(c) Zoom sur le méristème racinaire du riz

absorbants, cette couche a également la fonction de puiser les nutriments dans le sol. A l'intérieur de l'épiderme se trouvent les tissus internes. Selon les espèces, leur organisation est plus ou moins complexe. Par exemple, chez *A.thaliana* ils se résument à deux tissus monocouches: le cortex et l'endoderme (**Figure 2 a**), tandis que chez le riz plus de couches sont formées avec de l'extérieur vers l'intérieur : l'exoderme, le sclérenchyme, le cortex et l'endoderme (**Figure 2 b**). Dans la littérature, les tissus internes (entre la stèle et l'épiderme) sont parfois regroupés sous un terme générique, le cortex (Lux, Luxova et al. 2004). En effet, les tissus internes des Angiospermes dérivent tous d'une même cellule initiale, qui est à l'origine de toutes les couches cellulaires. Les différenciations tardives des cellules corticales génèrent de l'endoderme pour la couche la plus interne et du sclérenchyme ou de l'exoderme pour les couches les plus périphériques (Kawata S 1965). Chacun de ces tissus présente une fonction bien précise : l'exoderme et l'endoderme forment des barrières sélectives aux ions vers les tissus conducteurs. Leurs parois se différencient en cadres de Caspary, qui sont des cadres imperméables constitués d'une substance cireuse appelée la subérine. Grâce à ces structures, ces tissus contrôlent le transport des nutriments et de l'eau dans la racine, et jouent également un rôle dans la défense contre les pathogènes (Geldner 2013). Le sclérenchyme avec ses parois fortement lignifiées est un tissu de soutien, conférant une solidité particulière à la racine. Il a également un rôle de barrière à certains métaux toxiques tel que l'aluminium (Rebouillat, Dievart et al. 2009). Le cortex est la zone centrale où se concentrent les réserves. Selon l'espèce et selon le stade, cette couche est d'épaisseur variable (une couche chez *A.thaliana* et d'une à douze couches chez le riz). Certaines des cellules corticales peuvent entrer dans un programme de mort cellulaire nommé lysogénie, qui conduit à la formation de cavités appelées aérénchymes.

### I.3 Mise place des systèmes racinaires

Les tissus racinaires sont mis en place au cours du développement au niveau de zones mitotiquement actives appelées méristèmes racinaires (Evert and Esau 2006; Gregory 2006). Les méristèmes sont des zones de croissance et de prolifération présents chez toutes les plantes terrestres. Ils sont à l'origine de l'ensemble des cellules de la plante, qui par la suite se différencieront et donneront naissance aux différents tissus et organes. Le méristème apical racinaire (RAM) génère donc les différents tissus racinaires, qui se mettent en place autour d'un groupe de cellules appelé centre quiescent (QC) (**Figure 3**). Ce QC est présent dans l'ensemble des racines des plantes supérieures et sa taille est proportionnelle au diamètre racinaire (Clowes 1984). Il peut être très petit, quatre cellules chez *A.thaliana* (Clowes 1984) mais peut atteindre plusieurs milliers de cellules chez le maïs (Clowes 1984; Dolan, Janmaat et al. 1993). Le QC se compose de cellules qui ne se divisent pas ou très peu. Chez *A.thaliana* et le riz, les cellules les plus internes nommées « initiales » se trouvent autour du QC (Clowes 1958; Clowes 1978). Chez *A.thaliana* elles sont appelées Cortex-Endodermis-Initiales (CEI) et chez le riz Common-Endodermis-Exodermis- Initiales (CEEI). Ces cellules ont la particularité d'être totipotentes (Evert and Esau 2006) ce qui signifie qu'elles





peuvent se différencier en n'importe quel type de cellules. Elles se divisent de façon anticlinale (perpendiculairement à la surface) pour donner les cellules initiales dites « filles » (CEID ou CEEID) qui sont adjacentes aux CEI. Les cellules filles se divisent à leur tour de façon péricleinale (parallèlement à la surface) et augmentent ainsi le nombre de cellules par couches et forment les tissus internes. Ces couches se différencieront en endoderme et cortex chez *A.thaliana* ; en épiderme, exoderme, sclérenchyme, cortex et endoderme chez le riz.

## II. Le Cortex

### II.1 Origine et évolution du cortex

Les cellules corticales sont originellement considérées comme des cellules parenchymateuses (Clark and Harris 1981). Le parenchyme est, par définition, un tissu composé de cellules vivantes qui présentent des morphologies et des physiologies variées et qui sont capables de croître et de se diviser (Evert and Esau 2006). Ces cellules sont peu différenciées et remplissent diverses fonctions telles que l'activité photosynthétique, des fonctions de stockage ou autres activités métaboliques. Le terme « cortex » est également utilisé pour désigner l'ensemble des tissus internes (Lux, Luxova et al. 2004; Gregory 2006). En effet, tous ces tissus sont issus de divisions successives d'une même cellule initiale. Selon cette définition, toutes les couches produites par cette initiale appartiendraient à un même tissu (le cortex), et acquerraient des identités et des propriétés fonctionnelles distinctes. La différenciation des parois cellulaires en cadres de Caspary ou leur épaissement par un phénomène de lignification engendrerait la différenciation des cellules dites corticales en endoderme, exoderme ou sclérenchyme, et leur conférerait des fonctions particulières. L'utilisation du terme cortex est donc à préciser. Dans le cadre de notre travail, nous désignerons par cortex les couches de cellules comprises entre l'endoderme et le sclérenchyme, et nous utiliserons le terme générique « tissus internes » pour désigner l'ensemble des couches de cellules comprises entre la stèle et l'épiderme.

Le cortex est un tissu composé d'un nombre de couches variables. Le riz et le maïs sont composés de plusieurs couches de cortex, dont le nombre varie au cours du développement et selon les conditions environnementales, tandis qu'*A.thaliana* n'en comporte qu'une seule. Une récente étude a mis en évidence une augmentation du nombre de couches de cortex chez *A.thaliana* en cas de stress abiotique (Cui 2015), suggérant un rôle de ce tissu dans l'adaptation au déficit hydrique. En plus de faire varier le nombre de couches, certaines espèces sont aussi capables de former des structures particulières au sein de ce tissu, appelées aérenchymes (paragraphe I.2). Les aérenchymes sont des cavités aérifères qui permettent une meilleure diffusion de l'oxygène dans les racines de riz et confèrent ainsi une adaptation du tissu aux conditions de submergence (Coudert, Perin et al. 2010; Zhu, Brown et al. 2010). Ces aérenchymes peuvent aussi être formés en réponse à un

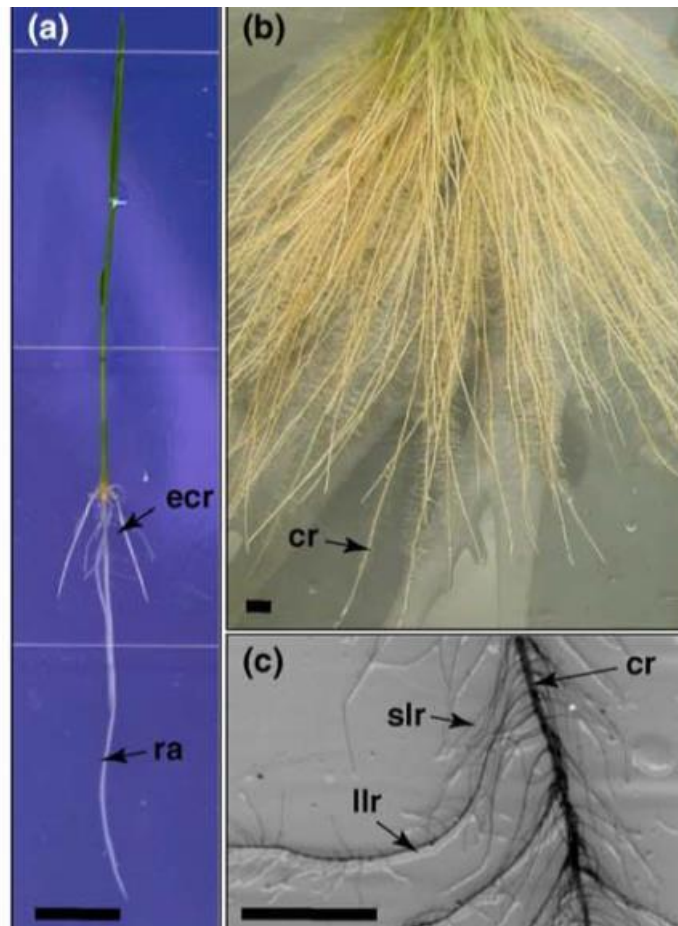


déficit hydrique ou à des stress édaphiques. Dans des conditions de carence en azote, phosphore ou sulfate, le maïs est capable de former des aérénchymes pour augmenter les apports en nutriments et combler ce déficit (Drew, He et al. 1989; Bouranis, Chorianopoulou et al. 2003; Fan, Zhu et al. 2003). La capacité du cortex à augmenter sa surface d'aérénchymes permet à la plante de diminuer ses consommations énergétiques (moins de cellules à alimenter) et de conserver le même volume de sol exploré. Cette faculté permet donc à la plante de conserver une dynamique de croissance en conditions de carences. Le tissu cortical a donc un rôle structurel, fonctionnel et adaptatif essentiel pour les racines, et particulièrement chez le riz.

## II.2 L'inner-cortex et sa régulation

Chez *A.thaliana* certaines cellules endodermales ont la particularité de pouvoir se diviser tardivement et de produire une couche supplémentaire de cortex (Baum, Dubrovsky et al. 2002). Cette couche n'est pas issue des divisions méristématiques des cellules initiales qui sont à l'origine de l'ensemble des cellules des tissus internes, mais elle est formée à partir d'une division périclinal d'une cellule d'endoderme située en face d'un pôle de xylème (Paquette and Benfey 2005). Cette division n'est observée que chez des racines âgées de plus d'une semaine (Baum, Dubrovsky et al. 2002; Paquette and Benfey 2005) et est appelée « middle cortex » en raison de sa position anatomique centrale entre l'endoderme et le cortex. Bien que ces cellules aient une morphologie plus proche des cellules de l'endoderme (forme allongée et paroi épaissie), elles ont des caractéristiques moléculaires propres aux cellules corticales (Paquette and Benfey 2005). Le contrôle génétique de la mise en place de cette couche implique les facteurs de transcription SHORT-ROOT (SHR) et SCARECROW (SCR) (Paquette and Benfey 2005; Koizumi, Hayashi et al. 2012).

La présence de ce tissu a également été décrite chez le riz (Pauluzzi, Divol et al. 2012). Tout comme chez *Arabidopsis thaliana*, cette couche serait localisée entre l'endoderme et les couches de cortex, et serait issue du même processus, à savoir une division tardive d'une cellule d'endoderme. Ce tissu est décrit chez plusieurs cultivars de riz, tels que *Nipponbare* mais aussi chez l'espèce sauvage *Zizania latifolia* (Yang, Zhang et al. 2014), où elle est nommée inner-cortex. Le terme « middle-cortex » est ambigu chez les monocotylédones, car il est parfois utilisé pour désigner les couches centrales se différenciant en aérénchymes (Baluška, Brailsford et al. 1993; Kawai, Samarajeewa et al. 1998). Le terme inner-cortex est aussi utilisé chez le maïs pour décrire la couche de cortex adjacente à l'endoderme (F. Baluška 2001), qui se distingue de l'outer-cortex par la forme de ces cellules, leur croissance, et la distribution des microtubules (Esser 1997). Cependant, aucune information ni sur son origine ni sur sa régulation ne sont disponibles dans la littérature. Etant donné l'ambiguïté du terme « middle-cortex », nous avons choisi de désigner par le terme d'inner-cortex la couche adjacente à l'endoderme formée par divisions péricinales tardives de ce tissu, et par le terme d'outer-cortex les couches de cortex issues des divisions méristématiques lors de la formations des primordia racinaires (cf. Chapitre 1).



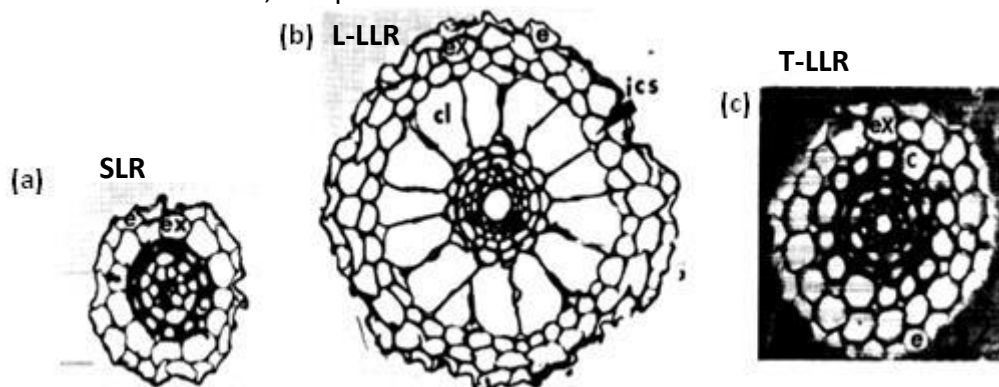
**Figure 4: Architecture du système racinaire du riz (Coudert, Perin et al. 2010).** Barres=1cm

(a) Architecture racinaire d'une plantule *Nipponbare* âgée de 6 jours.

(b) Architecture racinaire d'une plante *Nipponbare* âgée de 40 jours.

(c) Détails d'une racine coronaire.

Abréviations : ra= radicule ; ecr= racines embryonnaires coronaires ; cr= racines coronaires ; llr= grande racines latérales ; slr : petites racines latérales.



**Figure 5: Anatomie des racines latérales du riz (Kono, Igeta et al. 1972) .**

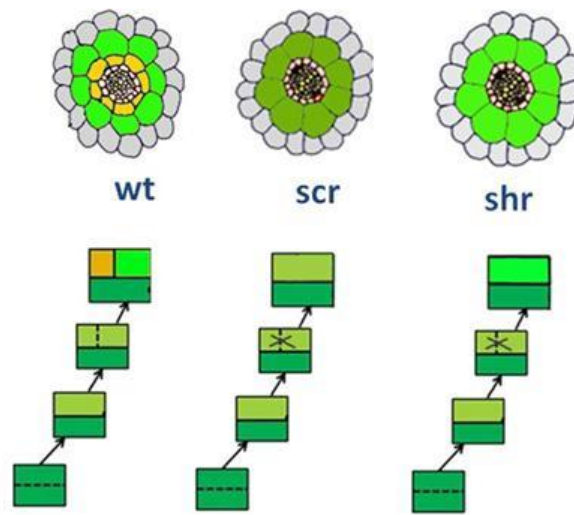
(a) Architecture racinaire d'une SLR, avec 2 couches de tissus internes et une stèle sans métaxylème central.

(b) Architecture racinaire d'une L-LLR, avec 5 couches de tissus internes et une stèle avec un métaxylème central.

(c) Architecture racinaire d'une T-LLR, avec 4 couches de tissus internes et une stèle avec un métaxylème central. Abréviations : e=épiderme ; ex= exoderme ; ics= inner-cortex sclérenchymateux ; c= cortex.

## II.3 Variation du nombre de couches de cortex selon les types racinaires

Il existe plusieurs types de racines chez les riz, qui se distinguent par leur organisation et leur stade d'apparition dans le développement de la plante. La première racine formée est la racine séminale qui apparaît au cours de la germination. Elle précède la formation des racines coronaires qui émergent de la tige (Coudert, Perin et al. 2010) (**Figure 4 a**). Ces deux types de racines ont la même organisation, et ont la particularité de pouvoir se ramifier en racines latérales (Smith and De Smet 2012). Il existe deux types de racines latérales chez le riz : les grandes racines latérales (Large Lateral Roots, LLR), caractérisées par une croissance indéterminée et un géotropisme positif ; et les petites racines latérales (Small Lateral Roots, SLR), qui sont plus nombreuses, plus courtes, à croissance déterminée et agéotropiques (Coudert, Perin et al. 2010). On peut également les différencier par leur diamètre et leur organisation tissulaire (Kono, Igeta et al. 1972). Les SLR sont caractérisées par un petit diamètre (50 à 60  $\mu\text{m}$ ) et une absence de métaxylème dans la stèle. Elles sont composées de trois couches de tissus internes : une couche d'endoderme, une couche appelée cortex-sclérenchymateux (Kono, Igeta et al. 1972) ou sclérenchyme (Rebouillat, Dievart et al. 2009) et une couche d'exoderme (**Figure 5 a**). Les LLR présentent toutes un métaxylème central et un nombre variable de tissus internes. Il en existe deux sortes: Les « larges » (Large-LLR, L-LLR) et les « fines » (Thin-LLR, T-LLR). Les L-LLR ont un diamètre plus large (entre 120 et 150  $\mu\text{m}$ ) et présentent une organisation semblable aux racines séminales avec 3 ou 4 couches de cortex entourées par une couche d'endoderme d'un côté, et par du sclérenchyme et de l'exoderme de l'autre (**Figure 5 b**). Les T-LLR sont plus petites avec un diamètre de 80 à 120  $\mu\text{m}$  et moins de tissus internes : 2 à 3 couches de cortex et pas de sclérenchyme (**Figure 5 c**). Les racines séminales, coronaires et latérales présentent des anatomies similaires mais diffèrent en termes de diamètre. Ce diamètre est corrélé au nombre de couches de tissus internes qui composent les racines, et plus particulièrement au nombre de couches de cortex, qui peut varier d'une à douze couches. Ainsi, cette variation dépend de plusieurs facteurs tels que le type de racines (Waisel, Eshel et al. 2002), les conditions environnementales; et le stade de développement de la plante. En effet, l'apparition de la couche d'inner-cortex issue de divisions de l'endoderme, n'apparaît qu'à un stade tardif où les racines séminales sont âgées de plus de 6 jours (Pauluzzi, Divol et al. 2012).

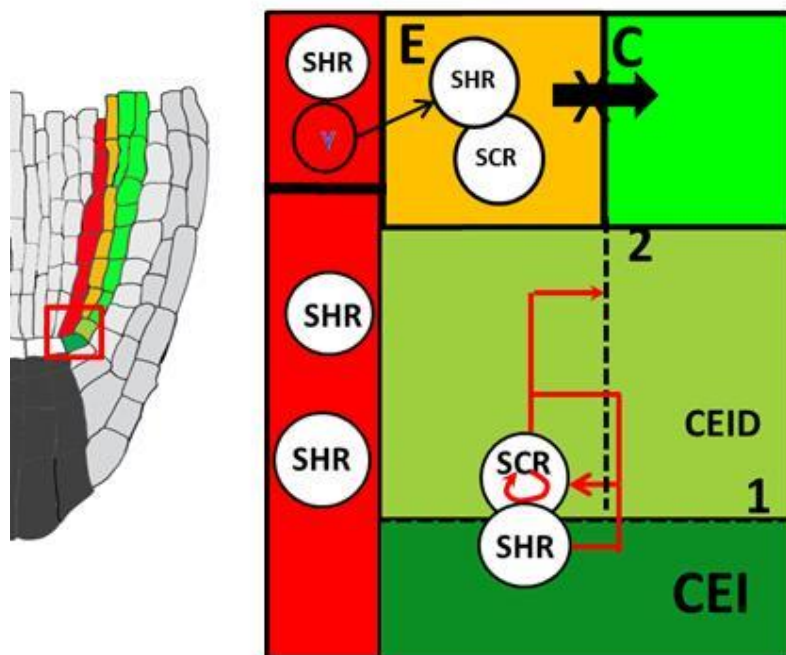


**Figure 6: Mutants *scr* et *shr* chez *A. thaliana* (Pauluzzi, Divol et al. 2012).**

(a) Organisation des tissus internes chez le Wild Type (WT).

(b) Organisation des tissus internes du mutant *scr* avec une seule couche d'identité mixte, cortex/endoderme.

(c) Organisation des tissus internes du mutant *shr* avec une seule couche d'identité corticale.



**Figure 7: Modification du modèle proposé par Cui et al.(Cui, Levesque et al. 2007).**

A gauche, vue partielle d'un méristème racinaire d'*A. Thaliana* avec les tissus internes et le péricycle colorés : péricycle (rouge), endoderme (orange), cortex (vert clair), CEID (vert pale), CEI (vert foncé). AtSHR est transcrit dans la stèle (péricycle) puis la protéine migre dans la CEID ou elle active SCR. AtSCR active également sa propre transcription et induit la formation d'une division asymétrique péricle (2) conduisant à la séparation cortex/endoderme. AtSHR, et un facteur Y (qui est soit exprimé dans la couche de tissu interne, soit migrant de la stèle comme AtSHR), sont nécessaire à la spécification de l'endoderme. AtSCR séquestre AtSHR dans le noyau en l'empêchant de migrer au-delà de l'endoderme.

### III. Contrôle de la mise en place des tissus internes chez *Arabidopsis thaliana*

Les tissus internes sont mis en place au niveau du centre quiescent du méristème apical racinaire. L'activation des divisions asymétriques des cellules initiales et l'acquisition d'une identité des cellules produites relèvent d'un mécanisme finement contrôlé dans la plante. Ce contrôle a fait l'objet de nombreuses études qui ont permis d'identifier des membres de la famille multigénique GRAS (GIBBERELIC ACID INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR of GAI (RGA) et SCARECROW) comme des éléments clés du développement racinaire. Cette famille doit son nom aux initiales des trois premiers membres identifiés, et regroupe des facteurs de transcription spécifiques aux plantes (Di Laurenzio, Wysocka-Diller et al. 1996; Pysh, Wysocka-Diller et al. 1999; Silverstone, Tseng et al. 2007). Un grand nombre de ces protéines est impliqué dans des processus développementaux.

#### III.1 *AtSHR* et *AtSCR* : deux gènes clefs impliqués dans la formation du cortex chez *A.thaliana*

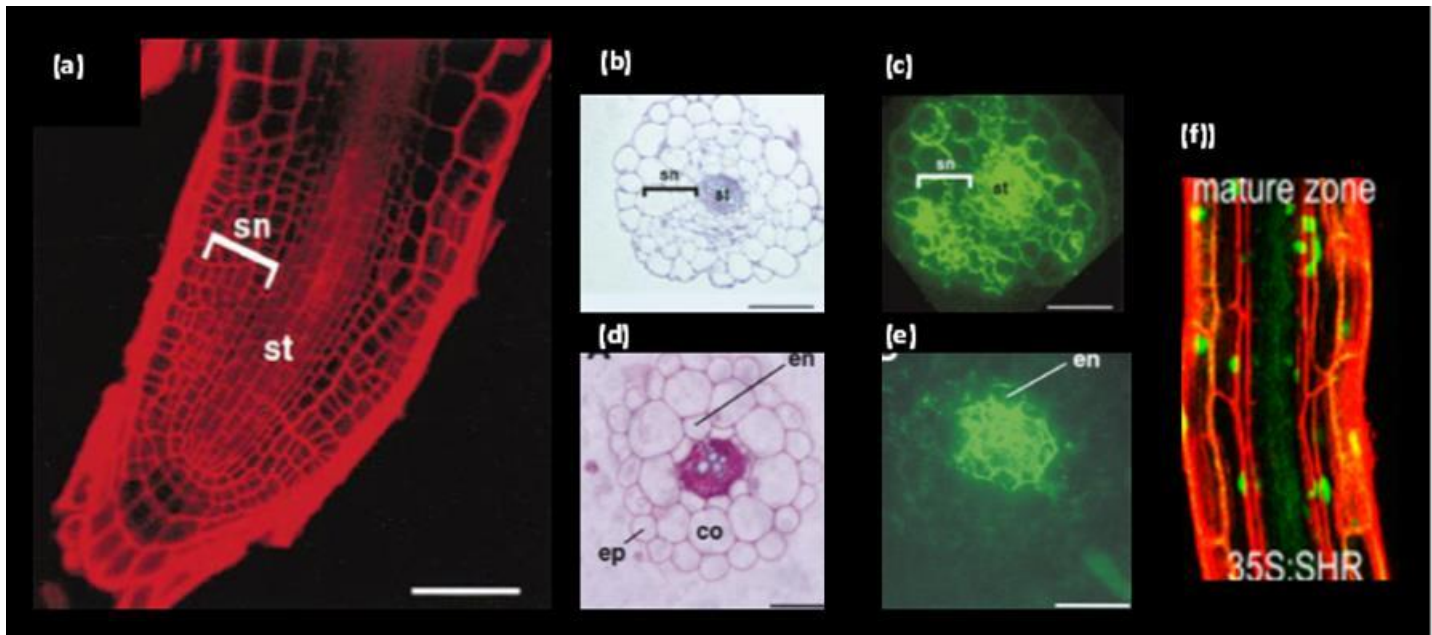
Chez *Arabidopsis thaliana*, l'étude de mutants de deux facteurs de transcription (FT) SHR et SCR ( *shr* et *scr*) de la famille GRAS ont permis de mettre en évidence leurs rôles respectifs dans la mise en place des tissus racinaires. La synthèse des travaux concernant la fonction de *SHR* a récemment été publiée dans une revue réalisée par Y. Long (Long, Scheres et al. 2015).

Les mutants *shr* et *scr* ont tous les deux un phénotype similaire caractérisé par une diminution/arrêt de la croissance racinaire et la présence d'une seule couche de tissu interne au lieu des deux couches, cortex et endoderme, normalement présentes. Ces deux gènes sont donc impliqués dans la mise en place de ces tissus (**Figure 6**). En l'absence du gène *SHR*, aucune couche d'endoderme n'est formée et la seule couche présente a une identité corticale. Chez le mutant *scr*, la couche formée présente une identité mixte endoderme-cortex. Ces résultats ont permis de conclure que *SCR* contrôle la division péricleinale de l'initiale cortex-endoderme (CEI) permettant la séparation de l'endoderme et du cortex. Quant à *SHR*, il est aussi requis pour le bon déroulement de cette division, mais est de plus nécessaire à la spécification de l'endoderme (Benfey, Linstead et al. 1993; Di Laurenzio, Wysocka-Diller et al. 1996; Helariutta, Fukaki et al. 2000).

#### III.2 Modèle moléculaire de la mise en place des tissus internes

Les analyses moléculaires menées sur les lignées transgéniques des gènes *SHR* et *SCR* (lignées des mutants perte de fonction, lignées complémentées, et lignées surexprimeurs) ont permis de définir un modèle moléculaire de leur fonctionnement au sein de la mise en





**Figure 8: Identité des couches surnuméraires formées par la surexpression d'*AtSHR***

(a-e) Travaux publiés dans (Helariutta, Fukaki et al. 2000), et (f-h) (Wu, Lee et al. 2014)

(a) Image confocale d'une coupe longitudinale de racine de plantule p35S:AtSHR. (b) Coupe radiale d'une plantule p35S:AtSHR avec la présence de couches surnuméraires.

(c) Coupe radiale d'une plantule p35S:AtSHR avec les couches surnuméraires.

(c) Coupe radiale d'une plantule p35S:AtSHR avec les couches surnuméraires marquées par l'anticorps JIM13 en plus de la stèle et de l'endoderme.

(d) Coupe radiale d'une plantule WT, avec une couche d'endoderme, une couche de cortex et une couche d'épiderme.

(e) Coupe radiale d'une plantule WT pour laquelle seuls l'endoderme et la stèle sont marquées par l'anticorps JIM 13.

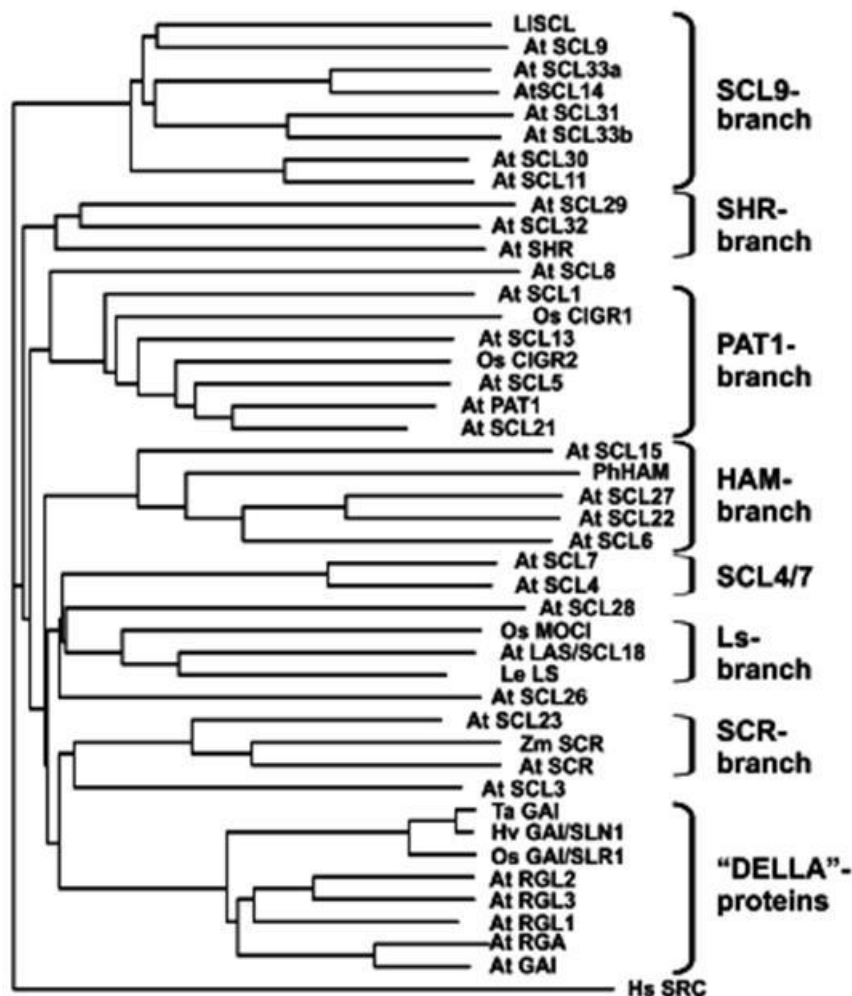
(f) Image d'une coupe longitudinale de plantule p35S:AtSHR colorée à l'iodure de propidium en rouge. En vert clair figure la localisation nucléaire de la protéine AtSHR, et en vert foncé la localisation de l'endoderme marqué avec le pEN7-HC.

Abréviations : Sn= couches surnuméraires ; st= stèle. ; ep= épiderme ; co= cortex ; en= endoderme.



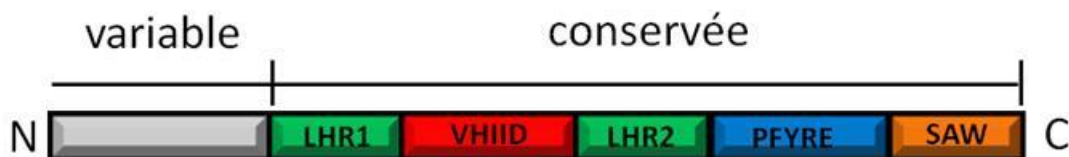
place des tissus internes (Levesque, Vernoux et al. 2006; Cui, Levesque et al. 2007; Welch, Hassan et al. 2007). Ce modèle a été revu et complété récemment, grâce à l'étude des homologues du riz (*OsSHR1&2*) et de *Brachypodium* (*BdSHR*) chez le mutant *shr-2* d'*A.thaliana* (Wu and Gallagher 2014). Une description simplifiée de ce modèle est présentée ci-dessous (**Figure 7**): Le gène *SHR* est exprimé au niveau de la stèle et sa protéine a la capacité de bouger dans les couches de cellules adjacentes (Nakajima, Sena et al. 2001). On la retrouve dans l'endoderme, où sa localisation est nucléaire, tandis que dans la stèle, elle est localisée dans le cytosol et les noyaux. La séquestration nucléaire dans l'endoderme de *SHR* est induite par *SCR*, par l'intermédiaire d'interactions protéines-protéines. *SHR* a également la capacité de migrer dans les cellules initiales et dans le QC, où elle active l'expression de *SCR*. Après induction, *SCR* et *SHR* activent la division asymétrique de la cellule initiale, permettant la formation des deux couches de tissus internes. *SHR* et *SCR* sont rapidement dégradées dans la couche externe qui va devenir du cortex, alors que dans la couche la plus interne, où *SHR* est séquestrée dans les noyaux par *SCR*, le tissu va se différencier en endoderme (Helariutta, Fukaki et al. 2000; Nakajima, Sena et al. 2001; Sena, Jung et al. 2004).

Les résultats publiés récemment par l'équipe de Kimberly Gallagher de l'université de Pennsylvanie, avec qui nous collaborons sur l'étude fonctionnelle des gènes *SHR* dans le développement racinaire, ont mis en évidence que *SHR* était nécessaire mais non suffisant à la spécification d'un tissu en endoderme (Wu and Gallagher 2014). Les couches surnuméraires présentes dans le surexprimeur *SHR* (**Figure 8 a**), auparavant identifiées comme de l'endoderme grâce à des anticorps pariétaux et des marquages à la berbérine (Nakajima, Sena et al. 2001; Cui, Levesque et al. 2007) (**Figure 8 b à d**), ont de nouveau été analysées et finalement identifiées comme du cortex. L'utilisation de marqueurs moléculaires spécifiques du cortex et de l'endoderme (Heidstra, Welch et al. 2004) a mis en évidence que les couches surnuméraires formées proche du méristème présentaient d'abord des caractéristiques de cellules d'endoderme (couches marquées par le marqueur d'endoderme), tandis qu'à un stade plus tardif, ces cellules présentaient des caractéristiques de cellules corticales (marquage par le marqueur cortex) (**Figure 8 f**). Ce résultat a été confirmé par la technique de coloration à l'iodure de Propidium (PI), dont la diffusion permet de différencier l'endoderme du cortex. En effet le PI a la capacité de se fixer aux parois des tissus internes, mais la présence des cadres de Caspary bloque la pénétration de cette molécule dans l'endoderme et empêche ainsi la coloration de ce tissu. Ces résultats ont finalement abouti à la conclusion qu'*AtSHR* était bien nécessaire à la formation de l'endoderme, qu'il était même capable d'induire des différenciations partielles endodermes dans les cellules où il était exprimé de manière ectopique, mais qu'il n'était pas suffisant à la spécification de ce tissu. Il existerait donc un interacteur encore inconnu noté Y dans le modèle **Figure 7**, qui, avec l'activité de *SHR*, pourrait spécifier la couche adjacente à la stèle en endoderme fonctionnel (Wu and Gallagher 2014). Le gène *SHR*, en plus de son rôle essentiel dans l'établissement des tissus racinaires, est également impliqué



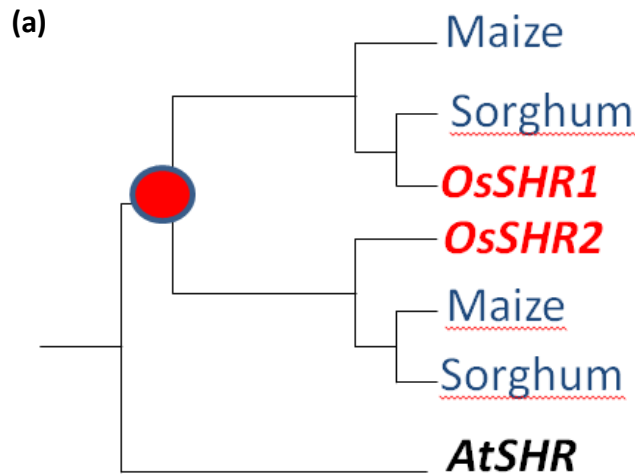
**Figure 9: Arbre phylogénétique des protéines GRAS, d'après (Bolle 2004).**

L'arbre enraciné (Hs SRC, Homo sapiens Protéine STAT) permet de regrouper les 33 protéines GRAS d'*Arabidopsis thaliana* (At) en 8 clades. Cet arbre illustre des protéines GRAS de plusieurs espèces telles que *Petunia hybrida* (petunia; Ph), *Lycopersicon esculentum* (tomate; Le), *Lilium longiflorum* (lily; Ll), *Oryza sativa* (riz; Os), *Hordeum vulgare* (orge; Hv) et *Zea mays* (maïs; Zm).

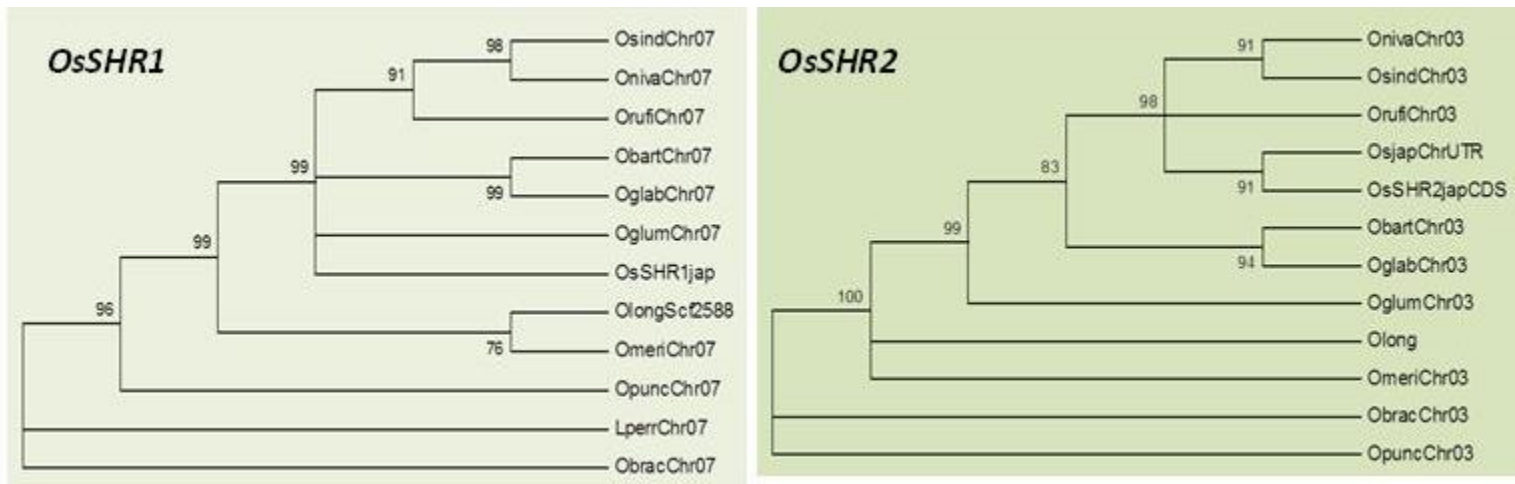


**Figure 10: Structure des protéines GRAS d'après (Bolle 2004).**

Représentation schématique de la structure des protéines GRAS. Elles sont composées d'une partie N-terminale variable et d'une partie C-terminale conservée. Cette dernière se subdivise en 5 domaines qui sont : les domaines Leucine Heptad Repeat (LHR) 1 et 2, les domaines VHIID, PFYRE et SAW, nommés en fonction des acides aminés conservés qui les composent.



(b)



**Figure 11: Arbre phylogénétique des gènes *SHR*.**

(a) Les gènes *OsSHR1* et *OsSHR2* sont apparus après une duplication ancienne chez les monocotylédones.

(b) Les gènes *OsSHR1* et *OsSHR2* se retrouvent chez les variétés sauvages de riz : *Oryza sativa indica* (Osind), *Oryza sativa japonica* (Osjap), *Oryza nivara* (Oniva) et *Oryza sativa rufipogon* (Orufi) qui sont les variétés japonaises ; *Oryza glaberrima* (Oglab), *Oryza barthii* (Obart) qui sont les espèces africaines ; *Oryza meridionalis* (Omer) variété australienne, *Oryza glumaepatula* (Oglum) variété sud-américaine ; et *Oryza punctata* (Opunc) et *Oryza brachyanta* (Obrach) qui sont des variétés plus anciennes. Les séquences des gènes de ces variétés ont été fournies par le laboratoire de Rod Wing (Arizona Genomic Institute) et ont été obtenues au sein du projet Oryza Map Alignement Project (OMAP).

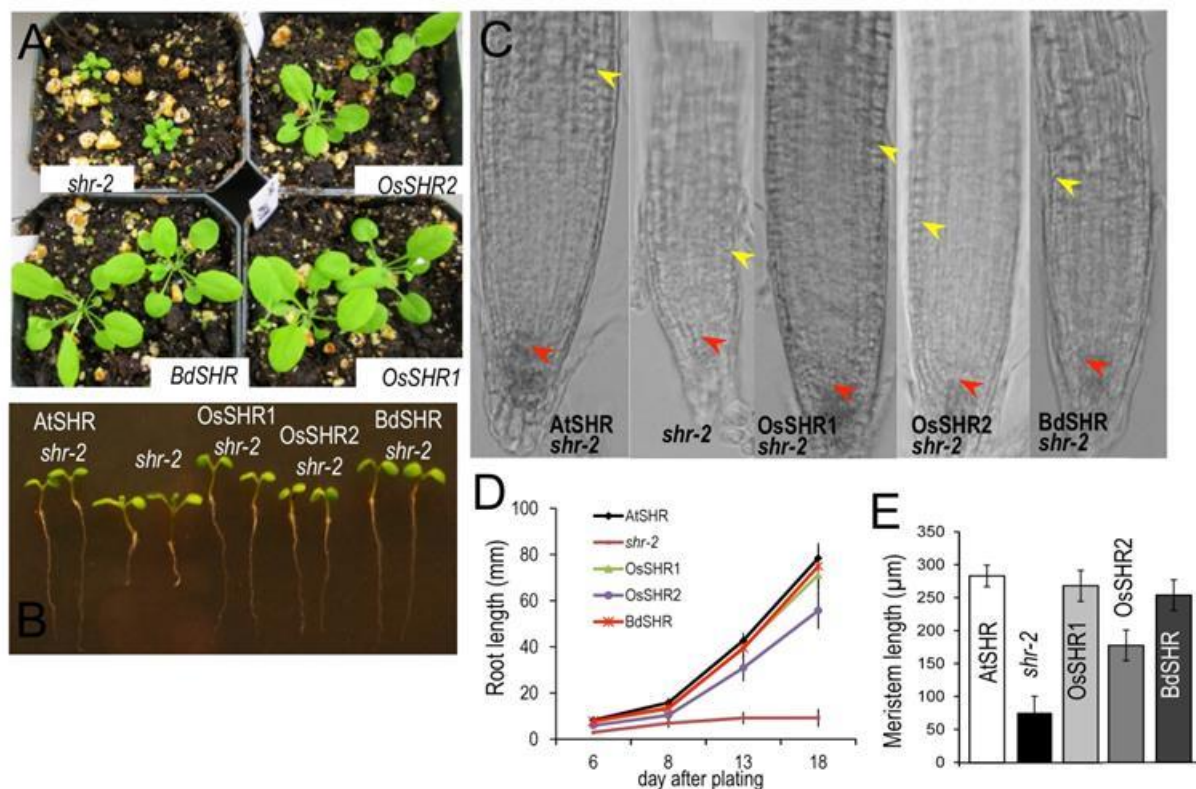


dans le maintien du centre quiescent et le développement de la stèle à travers l'activation transcriptionnelle des miRNA 165/166, qui régulent à leur tour les gènes de la famille des facteurs de transcription HD-ZIPIII (Carlsbecker, Lee et al. 2010). Il a donc un rôle prédominant dans la régulation du développement racinaire en général.

## IV. Orthologues à *AtSHR*

### IV.1 Conservation et évolution des protéines SHR

*SHR* et *SCR* sont deux membres de la famille de facteurs de transcription GRAS, qui est représentée chez tous les génomes séquencés des plantes supérieures (Gonzalez 2016). On compte 33 gènes chez *Arabidopsis thaliana*, 184 gènes pour le maïs (*Zea mays*), 112 pour le sorgho (*Sorghum bicolor*) et 60 pour le riz (*Oryza sativa*) (Gonzalez 2016). La famille GRAS est composée de plusieurs clades nommés d'après un ou plusieurs membres fondateurs, ou par la présence d'un motif commun: DELLA, HAM (HAIRY MERISTEM), PAT1 (PHYTOCHROME A SIGNAL TRANSDUCTION), LS (LATERAL SUPPRESSOR), SCR, SHR et SCL9 (**Figure 9**) (Bolle 2004). Les protéines GRAS sont des FTs spécifiques des plantes. L'identification de leur fonction comme FT a été définie par la présence de signaux de localisation nucléaire chez certaines d'entre eux (Tian, Wan et al. 2004), mais surtout par la capacité des protéines DELLA, SHR, NSP1 à se fixer aux régions promotrices de leurs gènes cibles (Cui, Levesque et al. 2007; Zentella, Zhang et al. 2007; Hirsch, Kim et al. 2009). Ces protéines sont hautement conservées entre les espèces, avec une zone spécifique en N-terminale, et une succession de domaines conservés en C-terminal (VHIID, PFYRE, SAW) dont le nom correspond aux acides aminés conservés qui les composent (**Figure 10**). Un sein d'un même clade les facteurs de transcription présentent des similarités de séquences très importantes entre les espèces et des fonctions similaires d'une espèce à l'autre (Gonzalez 2016). En effet, au sein du clade SHR, les protéines PtSHR du peuplier et AtSHR ont des séquences présentant 90% d'identité (Wang, Andersson-Gunneras et al. 2011), tandis que les protéines OsSHR1 et OsSHR2 de riz présentent 50% d'identité avec leur orthologue AtSHR. Les séquences sont très conservées, et la mutation d'un même acide aminé peut entraîner des effets similaires entre deux protéines. En effet, la mutation ponctuelle de la thréonine en alanine en position 289 de la protéine SHR d'*A.thaliana* inhibe sa mobilité et sa localisation nucléaire (Gallagher and Benfey 2009). La mutation de cette même thréonine bloque également la mobilité et altère la localisation nucléaire pour les orthologues du riz et de *Brachypodium* exprimés dans *A. thaliana* (Wu, Lee et al. 2014).



**Figure 12 : Complémentation du mutant *shr-2* par les homologues d'*AtSHR*** (Wu, Lee et al. 2014)

- (a) Phénotypes aériens des plantules *shr-2* âgées de 4 semaines, avec ou sans le transgène *SHR*.
- (b) Coupes longitudinales des racines des plantules *shr-2* âgées de 1 semaine, avec ou sans le transgène *SHR*.
- (c) Images du méristème chez des plantules *shr-2* âgées de 6 jours avec ou sans le transgène *SHR*.
- (d) Restauration de la croissance racinaire chez les plantules *shr-2* complémentées par les homologues d'*AtSHR* (n=3 réplicats, 24 racines par lignées).
- (e) Restauration de la taille du méristème racinaire chez les plantules *shr-2* complémentées par les homologues d'*AtSHR* (n=3 réplicats, 36 racines par lignées).

## IV.2 Les orthologues du riz

Deux orthologues d'*AtSHR* sont retrouvés chez le riz. Ils sont apparus après une duplication ancienne commune à tous les monocotylédones (**Figure 11 a**) et sont présents chez toutes les variétés de riz, même celles datant de plus de 8 millions d'années (Jacquemin, Bhatia et al. 2013) (**Figure 11 b**). Chez la variété de riz totalement séquencée et annotée *Nipponbare*, les séquences d'*OsSHR1* et *OsSHR2* sont très conservées avec près de 80% de similarité entre leurs séquences nucléotidiques et 70% d'identité entre leurs séquences protéiques. Ces deux gènes ne comportent pas d'introns.

Les évènements de duplications sont des événements importants dans l'évolution moléculaire d'un gène puisqu'ils peuvent être à l'origine de processus de néofonctionnalisation ou de subfonctionnalisation. Une néofonctionnalisation correspond à l'apparition d'une nouvelle fonction pour l'un des gènes dupliqués, tandis que lors d'une subfonctionnalisation, chaque co-orthologue assure une partie de la fonction du gène ancestral. L'existence d'orthologues d'*AtSHR* chez le riz et les ressemblances entre les anatomies racinaires des deux organismes ont déjà soulevé la question d'une conservation de fonction entre les gènes *SHR*. Des travaux ont donc été initiés il y a une dizaine d'années dans le but de répondre à cette question. Ainsi les travaux de Kamiya et al. (Kamiya, Nagasaki et al. 2003) et Cui et al. (Cui, Levesque et al. 2007) ont mis en évidence l'existence d'un profil d'expression similaire entre *OsSHR1* et *AtSHR*, principalement au niveau de la stèle, ainsi que l'existence d'une interaction entre les protéines *SHR* de riz et *OsSCR1*, à l'image de l'interaction entre *AtSHR* et *AtSCR* chez *A.thaliana*. Ces résultats ont conclu à l'existence d'une conservation de la fonction de *SHR* entre les espèces et à l'idée qu'il existe un mécanisme universel de formation de l'endoderme chez les plantes supérieures impliquant *SHR* et *SCR* (Cui, Levesque et al. 2007).

La récente publication réalisée par l'équipe de Kimberly Gallagher (Wu and Gallagher 2014), a remis en cause la conservation de fonctions entre le gène *AtSHR* et ses orthologues du riz et de *Brachypodium*. En effet, les gènes *SHR* de monocotylédones sont capables de compléter le mutant *shr-2* d'*A.thaliana* et de restaurer l'identité de la couche d'endoderme (**Figure 12**). Cependant, les trois lignées complémentées par *OsSHR1*, *OsSHR2* et *BdSHR* présentent des couches surnuméraires de cortex, engendrées par la migration des protéines au-delà de la couche d'endoderme. Bien que les interactions entre les protéines *SHR* monocotylédones et *AtSCR* aient lieu, les protéines *OsSHR1*, *OsSHR2* et *BdSHR* ne sont pas séquestrées dans la couche d'endoderme. Ces résultats suggèrent donc une conservation partielle des fonctions entre les gènes *SHR* des différentes espèces, mais indiquent aussi que les mécanismes de formation des tissus internes, et plus particulièrement du cortex, sont différents. Les protéines *OsSHR1*, *OsSHR2* et *BdSHR*, n'étant pas séquestrées dans l'endoderme, ont ainsi la capacité de migrer plus loin dans la racine et d'induire des divisions périclinales surnuméraires conduisant à la formation de plusieurs couches de cortex. Il semblerait qu'il y ait une corrélation entre la capacité de mouvement





des protéines SHR et le nombre de couches de tissus internes formées et plus particulièrement le nombre de couches de cortex. Sachant que le riz (Rebouillat, Dievart et al. 2009) et *Brachypodium* (Watt, Schneebeli et al. 2009; Pacheco-Villalobos and Hardtke 2012) sont des organismes comprenant plusieurs couches de cortex, une hypothèse peut être imaginée concernant la régulation de la mise en place de ce tissu dans ces organismes. Les protéines SHR de monocotylédones ne seraient pas séquestrées dans l'endoderme, et en migrant au-delà de cette couche, induiraient la formation de plusieurs couches de cortex. Le nombre limité et variable de couches de cortex formées serait dû à un gradient de protéines SHR dans ce tissu. Ce gradient serait formé grâce à une régulation fine du mouvement des protéines SHR ou alternativement par un contrôle de leur vitesse de dégradation. Enfin, ces résultats remettent en cause l'idée que *SHR* soit nécessaire et suffisant pour induire la spécification en endoderme : elle serait nécessaire mais non suffisante.

## V. Problématique de la thèse

L'Equipe DAR s'intéresse au développement racinaire du riz. Au sein de mon travail de thèse je me suis focalisée sur le tissu cortical, qui est un tissu clé pour l'adaptation du riz à différentes conditions de culture. Nous avons donc décidé dans un premier temps de réaliser une étude plus approfondie de ce tissu. Comment est-il organisé? Comment est-il mis en place et quelles sont ses particularités ? Ce travail a abouti à la réalisation d'une publication dont les résultats seront présentés dans le premier chapitre de ce manuscrit (Henry S 2015, in revision)

La comparaison des anatomies racinaires du riz et d'*A.thaliana* ainsi que les connaissances acquises sur la régulation de la mise en place des tissus internes chez cet organisme suggèrent que le mécanisme de formation est conservé entre les espèces. Nous nous sommes donc intéressés à la fonction des orthologues du gène *AtSHR* chez le riz, *OsSHR1* et *OsSHR2*, et à leurs implications dans la mise en place des tissus chez cet organisme. Pour cela nous avons effectué une comparaison de leurs rôles respectifs dans les deux espèces. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Kimberly Gallagher de l'université de Pennsylvanie, spécialisée sur la fonction de *SHR* chez *Arabidopsis thaliana*. Cette équipe s'est donc chargée d'étudier le rôle des gènes de riz chez cet organisme modèle, travail qui a fait l'objet d'une publication (Wu, Lee et al. 2014); tandis que nous nous sommes intéressé à la comparaison d'*OsSHR1&2* et d'*AtSHR* chez le riz. Ces travaux ont été initiés dans le but de comprendre la mise en place des tissus racinaires chez le riz et de pouvoir établir un modèle moléculaire de ce mécanisme. Nous avons pour cela défini des hypothèses auxquelles nous avons essayé de répondre tout au long de ce travail. Nous avons supposé que le mécanisme de régulation à l'origine de la mise en place des tissus racinaires était proche entre les deux organismes. Mais l'existence d'un nombre supérieur de couches de cortex chez le riz et la présence de deux gènes au lieu d'un, suggère que ces mécanismes moléculaires diffèrent entre les deux espèces. Est-ce qu'il existe un gradient de protéines



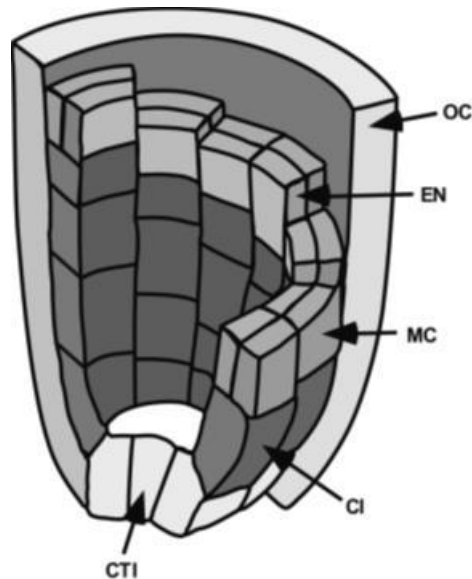
SHR dans la racine qui serait responsable de la variation du nombre de couches de cortex ? Quels sont les rôles respectifs d'*OsSHR1* et *OsSHR2* ? Pour répondre à ces questions nous avons entrepris de réaliser des lignées transgéniques perte et gain de fonction et de tester la mobilité des protéines par des fusions traductionnelles et transcriptionnelles. L'ensemble de ce travail fera l'objet du second chapitre de ce manuscrit.

Au sein de l'étude fonctionnelle des gènes *SHR* de riz dans la mise en place du cortex, nous avons été confrontés à des problèmes de régénération des plantes transgéniques générées par callogénèse. Nous nous sommes ainsi aperçus du rôle essentiel d'*OsSHR1* dans le processus de régénération des plantes, et avons donc décidé d'approfondir nos connaissances sur la fonction de ce gène durant ce processus. Cette étude a pour objectif de mieux comprendre le rôle de ce gène dans la formation des cellules souches et dans la régénération. Ces données seront présentées dans le troisième chapitre de la thèse, qui a pour but de rassembler les données préliminaires sur la fonction de ce facteur de transcription au cours du processus de régénération.



# **CHAPITRE I**

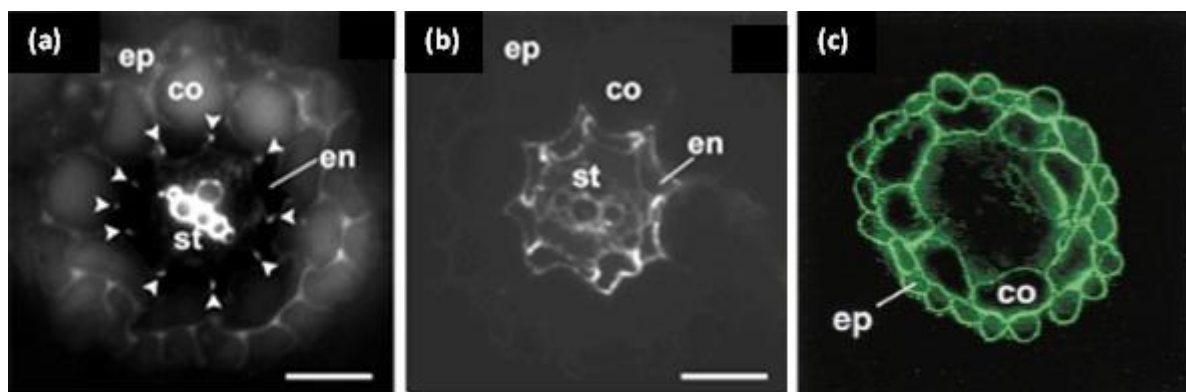
## **Formation et identité cellulaire du cortex racinaire chez le riz**



**Figure 1 : Schéma de l'apparition de la couche tardive de cortex chez *Arabidopsis thaliana*** (Baum, Dubrovsky et al. 2002)

Vision schématique 3D des divisions péricleinales illustrant l'apparition de l'hélice du middle-cortex (MC) ou de l'inner-cortex.

Abréviations : cellules initiales centrales (CTI), Initiale du cortex (CI), middle cortex (MC), endoderme (EN), outer-cortex (OC).



**Figure 2 : Utilisation de marqueurs histochimiques pour l'identification de l'endoderme d'*Arabidopsis thaliana*** (Helariutta, Fukaki et al. 2000; Sena, Jung et al. 2004)

(a) Coloration à la berbérine pour mettre en évidence la subérine présente dans les cadres de Caspary de l'endoderme.

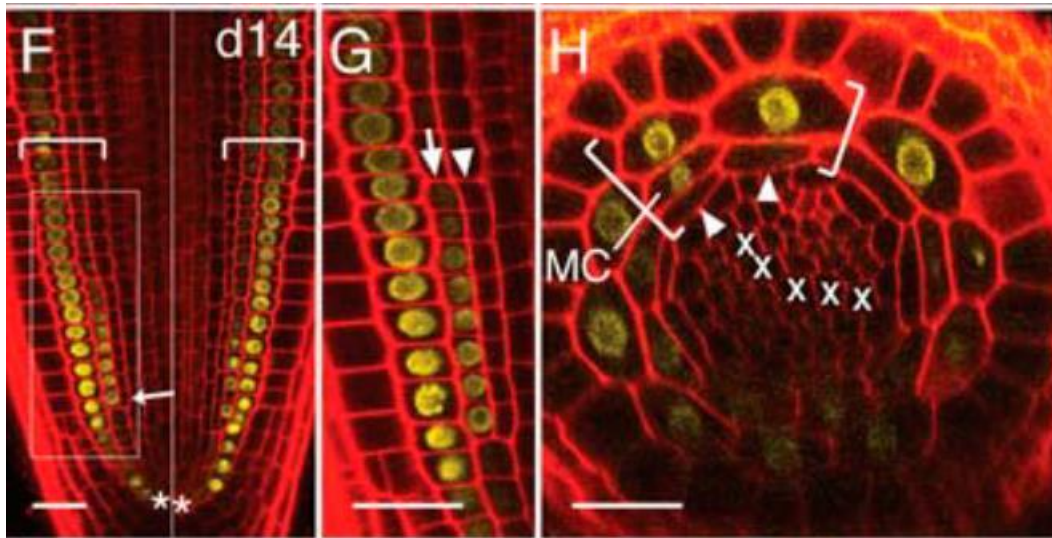
(b) Immunolocalisation avec l'anticorps JIM 13 dirigé contre des composants pariétaux présents dans l'endoderme.

(c) Immunolocalisation avec l'anticorps CCRC-M2 dirigé contre des composants pariétaux présents dans le cortex et l'épiderme.

## Introduction

Le système racinaire du riz est caractérisé par un ensemble de racines embryonnaires et post-embryonnaires qui se distinguent par leur anatomie, leur morphologie et leur arrangement spatial (Jung and McCouch 2013). Toutes ces racines ont cependant en commun une organisation concentrique, caractérisée par trois types de tissus : l'épiderme, les tissus internes et les tissus vasculaires (Gregory 2006). Les faisceaux vasculaires (xylème et phloème) sont situés au centre de la racine dans la stèle, autour de laquelle s'organisent les tissus internes (Rebouillat, Dievart et al. 2009). Le cortex est caractérisé par un nombre variable de couches (de une à douze) qui dépend du type racinaire, mais également du stade de développement de la plante (Pauluzzi, Divol et al. 2012). En effet, une couche de cortex adjacente à l'endoderme apparaît tardivement chez les racines séminales (Pauluzzi, Divol et al. 2012). Cette couche, que nous avons choisi d'appeler inner-cortex chez le riz, est également décrite chez *Arabidopsis thaliana* sous le nom de middle-cortex en raison de sa position entre les deux couches de tissus internes (Baum, Dubrovsky et al. 2002) (**Figure 1**). Cette couche est issue d'une division péricleinale tardive d'une cellule d'endoderme située en face d'un pôle de xylème. Elle apparaît sous forme d'hélice entre le 7<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour après la germination, à 30 - 60 µm au-dessus des cellules initiales. Cette couche acquiert rapidement une signature moléculaire propre du cortex (Baum, Dubrovsky et al. 2002; Paquette and Benfey 2005). Des marqueurs moléculaires ont été utilisés pour la différencier de l'endoderme, mais aucun outil n'est disponible à ce jour pour la distinguer de l'outer-cortex.

L'identité des différents tissus peut être caractérisée grâce à des marqueurs morphologiques, histochimiques ou moléculaires. Les plus anciens marqueurs utilisés sont basés sur des critères morphologiques ou histochimiques, tels que la berbérine qui colore la subérine présente dans les cadres de Caspary (Brundett, Enstone et al. 1988). Cette coloration a été utilisée à plusieurs reprises chez *A.thaliana* comme marqueur d'endoderme dans les tissus racinaires (Sena, Jung et al. 2004; Lux, Morita et al. 2005) (**Figure 2 a**). Une autre classe de marqueurs, basée sur les composantes histochimiques des cellules, correspond à des anticorps dirigés contre des composants pariétaux spécifiques des tissus. Ainsi, les anticorps JIM 13 (Knox 1990) et CCCR-M2 (Freshour 1996) ont été utilisés pour identifier l'endoderme et le cortex dans différentes lignées transgéniques (Di Laurenzio, Wysocka-Diller et al. 1996; Helariutta, Fukaki et al. 2000; Sena, Jung et al. 2004) (**Figure 2 b & c**). Des marqueurs basés sur les propriétés moléculaires des tissus ont été développés par la suite. Cette technique consiste à utiliser des promoteurs tissus-spécifiques et de les fusionner à des protéines rapportrices, comme les protéines GUS ou GFP. De ce fait, les promoteurs pCO2 et pEN7 (Heidstra, Welch et al. 2004) ont été utilisés comme marqueurs moléculaires spécifiques du cortex et de l'endoderme respectivement. Ils ont servis par exemple à identifier des couches surnuméraires produites dans des lignées transgéniques (Wu, Lee et al. 2014), ou à confirmer l'identité corticale de la couche formée tardivement



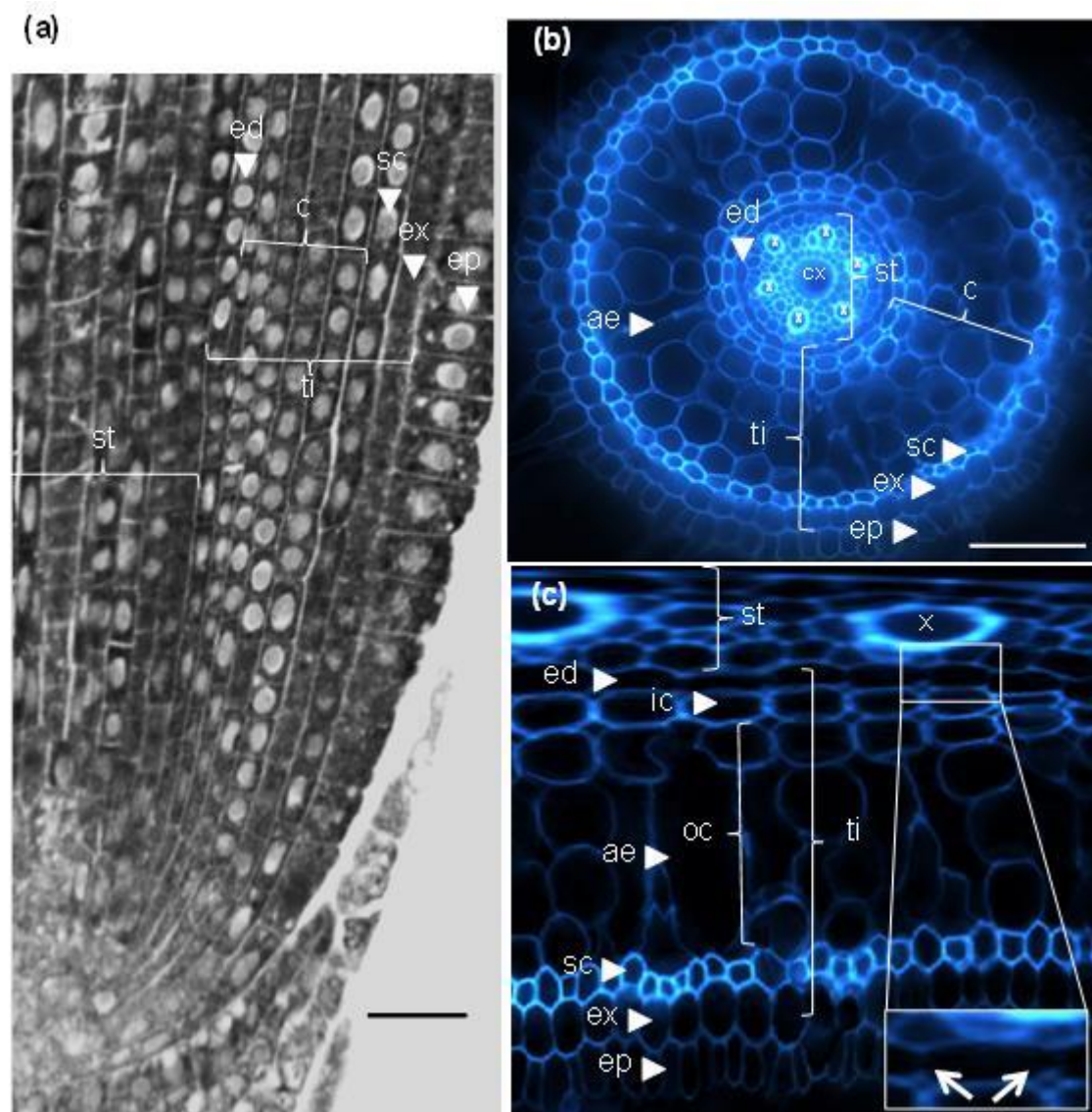
**Figure 3 : Utilisation du marqueur moléculaire pCO2 spécifique du cortex pour identifier la couche tardive d'inner-cortex chez *Arabidopsis thaliana* (Sena, Jung et al. 2004)**

Marquage de la couche d'inner-cortex formée dans une racine à 14 jours après germination, avec le promoteur du gène *CO2* fusionné à la protéine GFP, en coupes longitudinale et radiale.



chez *A.thaliana* (**Figure 3**). Tous ces marqueurs ont été développés chez la plante modèle *A.thaliana*, et n'ont pas été transposés aux autres espèces. Le seul marqueur spécifique du cortex existant chez le riz est basé sur des critères morphologiques tels que la présence d'aérenchymes (Rebouillat, Dievart et al. 2009). Sachant que les anticorps JIM 13 et CCRC-M2 ont prouvé leur efficacité chez *A.thaliana* nous avons décidé de cribler une banque d'anticorps dirigés contre des composés pariétaux, afin de caractériser des marqueurs d'identité spécifiques des tissus du riz. Cette technique présente l'avantage de passer outre la transformation génétique qui nécessite beaucoup de temps chez le riz (6 mois à un an), d'être rapide puisque ces anticorps sont utilisables sur des coupes fraîches et d'être compatible avec l'utilisation d'autres marqueurs (fusions GFP, GUS...).

Nous avons dans un premier temps réalisé une description détaillée du cortex et mis en évidence des différences morphologiques entre l'inner et l'outer-cortex. Un protocole d'immunolocalisation haut débit a été développé puis utilisé pour cribler une banque d'anticorps pariétaux, qui a permis d'identifier des marqueurs spécifiques du cortex racinaire. Ces marqueurs ont permis de démontrer que l'inner et l'outer cortex ont des signatures moléculaires distinctes. Dans la dernière partie sera présentée l'utilisation de ces marqueurs pour préciser l'identité des tissus internes présents dans les différents types de racines latérales. L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication intitulée "Two cortical domains are present in rice roots » (Henry, Divol et al. 2016).



**Figure 4 : Anatomie d'une racine séminale de *Nipponbare* âgée de 6 jours**

(a) Vue longitudinale d'une racine fixée en paraffine. Barre=100μm

(b) Coupe radiale d'une racine observée sous UV. Barre=50μm

(c) Application « Polar transform » du logiciel Image J de la même coupe radiale de (b), avec un zoom sur une cellule d'endoderme où les parois radiales ne fluorescent pas en raison de la présence probable des cadres de Caspary (indiqué par les flèches blanches dans l'agrandissement).

Abréviations : stèle (st), tissus internes (ti) compose de plusieurs couches: une couche d'endoderme (ed), plusieurs couches de cortex (c), une couche de sclérénchyme (sc) et une couche d'exoderme (ex). Les couches d'endoderme (ed) and d'exoderme (ex) se reconnaissent facilement en raison de l'extinction de la fluorescence dans leurs parois radiales. La racine séminale est protégée par une couche d'épiderme (ep). Deux types de cortex sont identifiés: l'inner-cortex (ic), adjacent à l'endoderme (ed), et l'outer-cortex (oc) où se localisent les aérénchymes (ae). Dans la stèle on relève la présence d'un métaxyleme central (cx), entouré de 6 faisceaux de xylème (x).

## I. Caractérisation des deux types de cortex

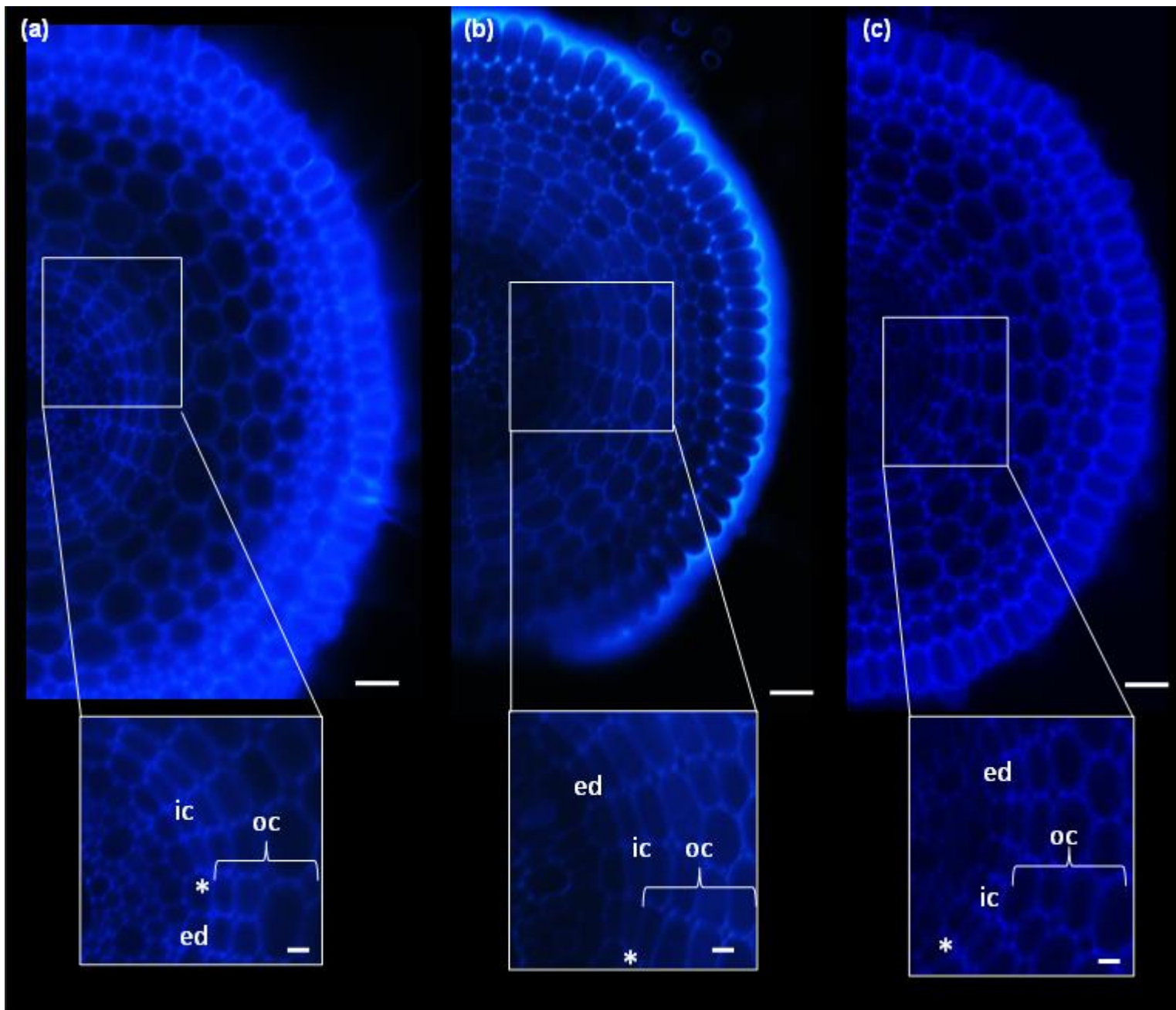
### I.1 Différences anatomiques entre l'endoderme et le cortex

L'étude anatomique des racines séminales de riz est généralement réalisée sur des plantules âgées de six jours (Rebouillat, Dievart et al. 2009; Pauluzzi, Divol et al. 2012). A ce stade, la racine est caractérisée par la présence de six pôles de xylème et de phloème dans la stèle, organisés autour du métaxylème central. Elle est organisée en 8 ou 9 couches de tissus internes : une couche d'endoderme, 5 à 6 couches de cortex, une couche de sclérenchyme et une couche d'exoderme et une couche d'épiderme périphérique (**Figure 4 a**). L'observation de coupes radiales sous lumière UV permet de mettre en évidence l'autofluorescence des parois et permet ainsi de distinguer les cellules individuellement (**Figure 4 b**). Six jours après germination, à 0,5 cm au-dessus de l'apex, la formation des aérénchymes est déjà initiée, on peut voir apparaître les cavités entre le sclérenchyme et la couche la plus interne du cortex, appelée inner-cortex. Cette couche se distingue morphologiquement des autres cellules avoisinantes. L'application « polar view » du logiciel Image J permet de visualiser une coupe radiale de racine avec les couches disposées parallèlement (Lartaud, Perin et al. 2014). Cette représentation met en évidence les différences morphologiques entre les différents tissus racinaires, et plus particulièrement entre l'endoderme, l'inner-cortex et l'outer-cortex (**Figure 4 c**). L'autofluorescence des parois radiales de l'endoderme est très faible probablement en raison de la présence des cadres de Caspary. Cette caractéristique permet de distinguer les cellules d'endoderme et d'inner-cortex qui ont une morphologie proche en ellipse aplatie. Cependant l'autofluorescence des parois des cellules de l'inner-cortex est plus intense et homogène entre les parois radiales et tangentielles. Les cellules d'outer-cortex sont quant à elles reconnaissables par leurs formes beaucoup plus arrondies et leurs parois plus fines, ainsi que par la présence d'aérénchymes. Ces derniers se forment exclusivement dans l'outer-cortex.

### I.2 Origine de la couche d'inner-cortex

L'apparition de cette couche a été bien décrite chez *A.thaliana* (Baum, Dubrovsky et al. 2002; Paquette and Benfey 2005). Nous avons voulu savoir comment cette couche apparaissait chez le riz, et si le mécanisme était similaire.

Chez le riz, cette couche d'inner-cortex apparaît également sous forme d'hélice, mais elle prend place très tôt dans le développement. Elle est visible dès le deuxième jour après germination, dans une zone proche du méristème, où les cellules ne sont encore pas bien différenciées (**Figure 5 a**). On voit en effet apparaître la dernière couche de cortex adjacente à l'endoderme. L'hélice est également visible les jours suivants (**Figure 5 b et c**). Contrairement à ce qui a été décrit chez *A.thaliana*, la couche d'inner-cortex semble apparaître à un stade plus précoce. Elle apparaîtrait juste après la germination, lors de la réactivation du méristème après l'épisode de dormance. En revanche l'observation de ces



**Figure 5 : Apparition de l'inner-cortex au niveau d'une hélice dès 2 jours après germination chez *Nipponbare***

Coupes radiales de racines séminales observées sous UV, avec un zoom au niveau de l'hélice. Barres=20μm

(a) Coupe radiale d'une racine après 2 jours de germination.

(b) Coupe radiale d'une racine après 3 jours de germination.

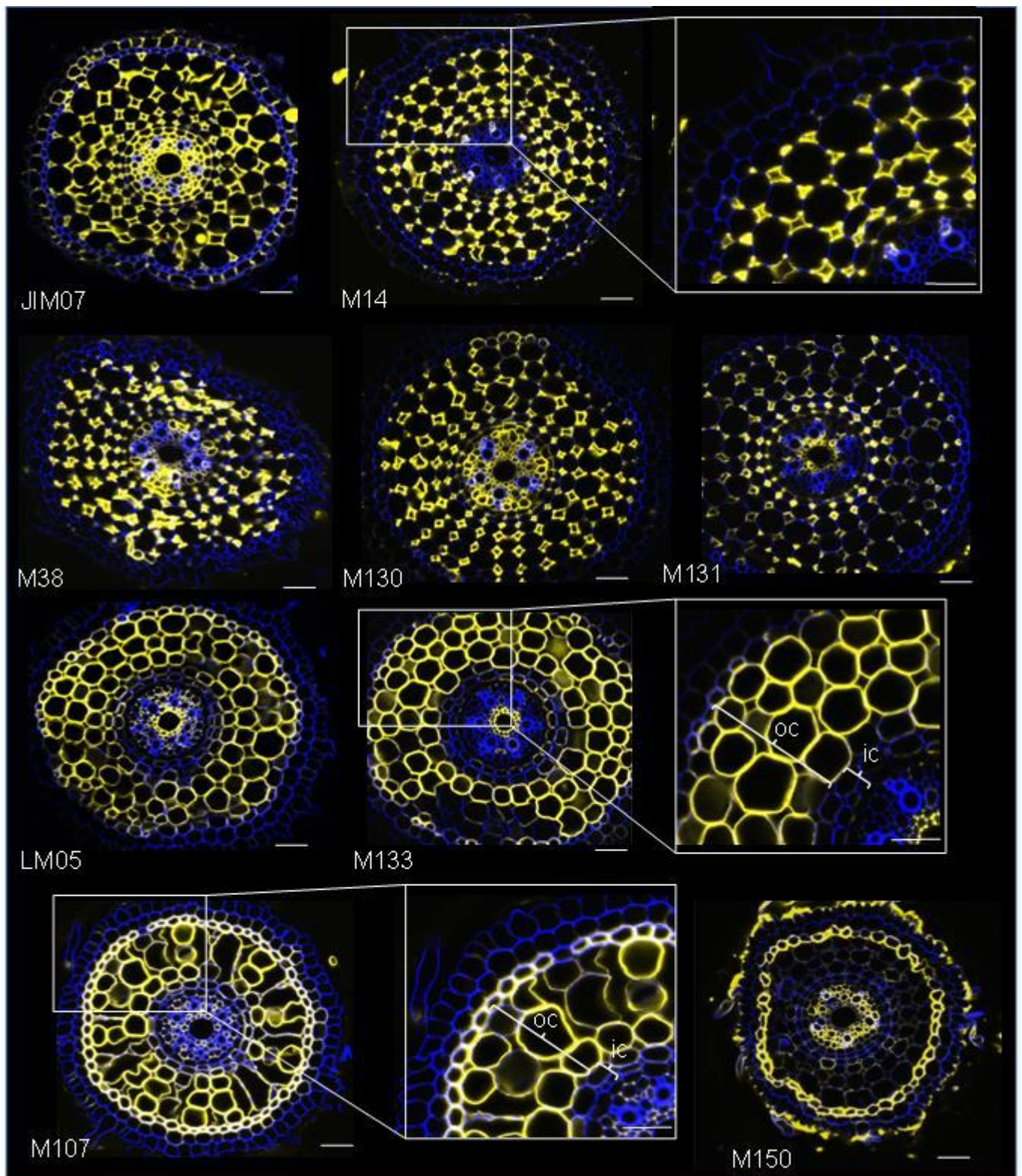
(c) Coupe radiale d'une racine après 5 jours de germination.

Abréviations : couche d'endoderme (ed), l'inner-cortex (ic) se forme au niveau d'une hélice (\*), et l'outer-cortex (oc).

coupes radiales à différents stades ne permet pas de conclure quant au mécanisme de formation de cette couche : ces coupes ne permettent pas de localiser le début de l'hélice ni de savoir si l'inner-cortex est formé à partir d'une division de l'endoderme ou d'une division tardive d'une initiale.

Pour répondre à ces questions et localiser le début de cette hélice nous avons réalisé des coupes sériées sur une racine de 6 jours à l'aide d'un vibratome couplé à un microscope biphotonique. Cette technique permet d'acquérir des images tous les 4  $\mu\text{m}$ . Ces images seront utilisées pour reconstituer un modèle 3D de la mise en place des cellules dans la racine, avec l'aide de l'équipe de Christophe Godin (INRIA, Virtual Plante, Montpellier). Cette reconstitution permettra de suivre la formation de l'inner cortex et d'identifier la division à l'origine de la première cellule de cette couche.





**Figure 6 : Immunolocalisation des 8 anticorps spécifiques du cortex**

Coupe radiale d'une racine séminale de *Nipponbare* âgée de 6 jours, observée au microscope confocal après immunolocalisation à l'aide des anticorps pariétaux. En bleu jaune figurent le marquage de l'anticorps observé à 561nm, et en bleu l'autofluorescence des parois observée sous lumières UV. Les 5 anticorps JIM07, M14, M38, M130, M131 montrent un marquage en diamants de ces cellules de cortex (inner et outer), tandis que les anticorps LM05, M133 and M107 marquent l'outer-cortex et le sclérenchyme. Le M 150 marque uniquement les parois du sclérenchyme ainsi que les cellules de la stèle. Abréviations : inner-cortex (ic) et l'outer-cortex (oc). Barres= 20µm

## II. L'inner et l'outer cortex présentent des signatures moléculaires distinctes

Les couches d'inner et d'outer-cortex sont morphologiquement différentes, mais aucun marqueur n'était disponible à ce jour pour les distinguer sur le plan moléculaire. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de cribler une banque de 174 anticorps dirigés contre des composés pariétaux provenant de l'institut Carbosources (Athens, USA) et du laboratoire de Paul Knox (University of Leeds, GB). Les épitopes de ces anticorps sont des composés pariétaux principalement localisés dans des molécules de pectine ou d'hémicellulose. Afin d'observer les immunolocalisations au microscope confocal, nous avons utilisé des anticorps secondaires fusionnés à un fluorochrome. Nous avons donc testé chacun de ces anticorps sur des coupes radiales de racines séminales de *Nipponbare* âgées de 6 jours.

A l'issu de ce criblage, 76 anticorps (43 %) présentaient un signal localisé dans le cortex, et 12 d'entre eux (6,7 %) lui étaient spécifiques. La robustesse de leur profil a été testée par trois répétitions indépendantes, et finalement 8 anticorps (4,5 %) ont donné des profils stables entre les répétitions (**Figure 6** et **Annexe 1**). Tous ces anticorps sont dirigés contre des composants de la pectine des parois cellulaires. Cependant ils présentent des profils distincts, témoignant d'une signature moléculaire propre à chaque tissu. Cinq de ces anticorps (JIM 07, M 14, M 38, M 130 et M 131) présentent un profil similaire dans le cortex. Le marquage est localisé au niveau des jonctions entre les cellules corticales dont la forme rappelle des diamants. Pour les trois autres anticorps (LM 05, M 107 et M 133) le marquage présente un profil différent : il se situe sur l'ensemble des parois des cellules du cortex et du sclérenchyme mais il présente un marquage différentiel entre l'inner-cortex et l'outer-cortex. En effet, la couche d'inner-cortex (adjacente à l'endoderme) présente un marquage très faible, voire nul pour certaines cellules. Ces anticorps donnent donc des profils complémentaires des différents types de cortex et peuvent ainsi être utilisés comme des marqueurs d'identité sur des racines différenciées. Un autre anticorps spécifique est ressorti de ce criblage : le M 150 qui est spécifique au sclérenchyme.

Ce marquage différentiel entre l'outer et l'inner-cortex témoigne d'une identité moléculaire propre à chacun des tissus : les cinq anticorps marquant les jonctions des cellules corticales sont dirigés contre l'homogalacturonane et le rhamnoglucane, qui sont des composés primaires de la pectine, donnant la structure au réseau pectinique. Les autres anticorps qui marquent préférentiellement l'outer-cortex sont dirigés contre le 1,4 $\beta$ -D galactane, le galactane et l'arabinane, qui sont des molécules qui assurent le lien entre les polysaccharides pariétaux (ce sont les chaînes latérales courtes présentes sur le squelette pectinique). Ces différences mettent en évidence que la différenciation des parois cellulaires ne serait donc pas identique entre toutes les couches. Cette variabilité de composition pourrait attribuer des propriétés particulières aux tissus racinaires.

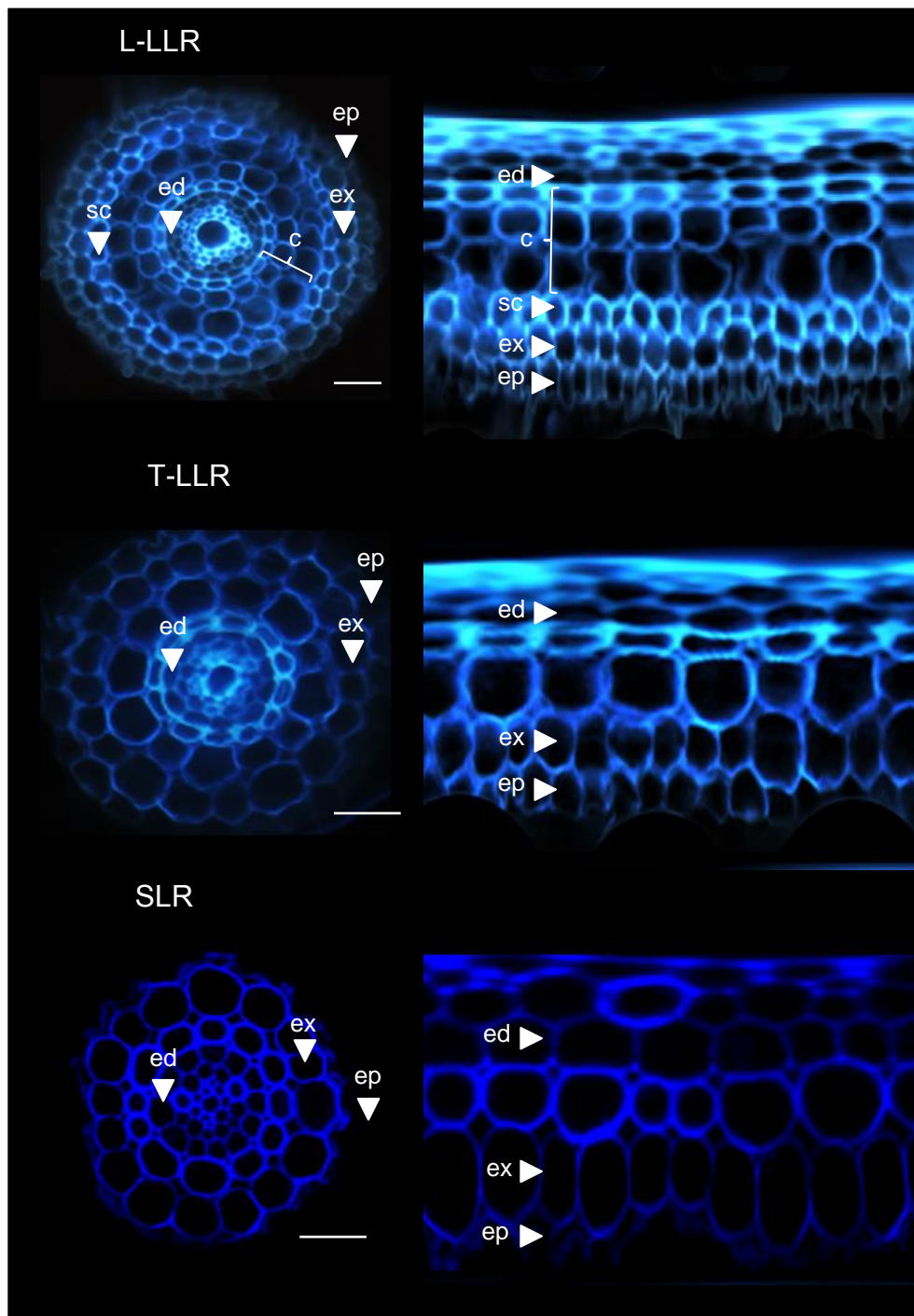




### **III. Le cortex dans les racines latérales : présence d'outer-cortex et absence d'inner-cortex**

Il existe deux types de racines latérales chez le riz : les petites racines latérales (SLR) et les grandes racines latérales (LLR). Elles se distinguent par leur diamètre et leur anatomie (Kono, Igeta et al. 1972; Rebouillat, Dievart et al. 2009). Les SLR sont plus courtes, plus fines (50–60  $\mu\text{m}$  de diamètre) et ont une composition plus simple : une stèle sans métaxylème central et trois couches de tissus internes dont l'identité est encore incertaine à l'heure actuelle. Dans l'étude de Rebouillat et al, les SLR sont décrites comme possédant une couche d'endoderme, une couche de sclérenchyme et une couche d'exoderme (Rebouillat, Dievart et al. 2009), tandis que dans une étude japonaise plus ancienne, cette couche de sclérenchyme est identifiée comme du cortex (Kono, Igeta et al. 1972). Les LLR sont plus larges (80 à 150  $\mu\text{m}$  de diamètre) ; elles ont une croissance indéterminée et sont caractérisées par un nombre plus important de tissus internes organisés autour d'une stèle présentant un métaxylème central. Il existe deux types de LLR qui diffèrent par leurs compositions tissulaires: les larges (L-LLR) ont organisation semblable à celles des racines séminales avec deux ou trois couches de cortex au lieu de cinq et une couche de cortex-sclérenchymateux, et les fines (Thin-LLR, T-LLR) qui présentent la même organisation que les L-LLR mais sans sclérenchyme.

L'identité des différentes couches de tissu interne soulève encore des interrogations, notamment pour la couche centrale des SLR. Nous avons donc décidé dans un premier temps de caractériser la morphologie de ces racines puis d'identifier les différents types de cortex présents en utilisant les marqueurs d'identité présentés ci-dessus. Les racines latérales étudiées ont été échantillonnées sur des racines séminales âgées de 6 jours cultivées sur boîtes de Pétri et sur des racines coronaires âgées de 4 semaines cultivées en hydroponie. Les L-LLR ne sont retrouvées que dans les échantillonnages de racines plus âgées, alors qu'à 6 jours ne sont présentes que les SLR et les T-LLR, selon un ratio 2:3 (Kono, Igeta et al. 1972).



**Figure 7 : Anatomies des racines latérales.**

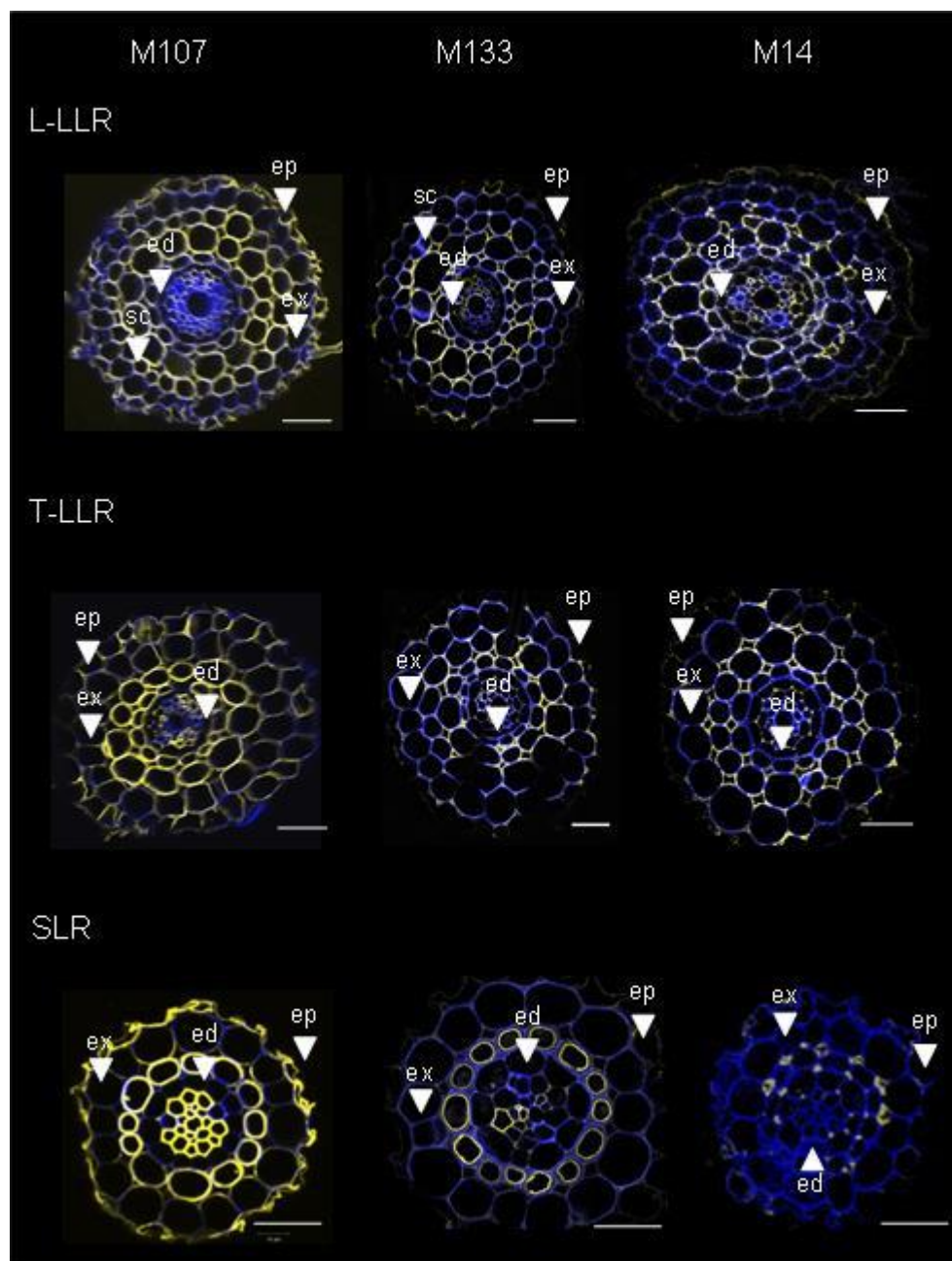
(a) Coupe radiale d'une L-LLR observée sous UV, caractérisée par la présence de tous les tissus racinaires (endoderme, cortex, sclérenchyme, exoderme et épiderme). Barre=20µm  
 (b) Application « Polar transform » du logiciel Image J de la même coupe radiale de (a).  
 (c) Coupe radiale d'une T-LLR observée sous UV, similaire à la L-LLR mais sans le sclérenchyme. Barre=20µm  
 (d) Application « Polar transform » du logiciel Image J de la coupe radiale (c).  
 (e) Coupe radiale d'une SLR observée sous UV, caractérisée par trois couches de tissus internes dont l'endoderme et l'exoderme, la couche centrale n'est pas encore définie. Barre=20µm. (f) Application « Polar transform » du logiciel Image J de la même coupe radiale de (e). Abréviations : Large- Large Lateral Roots (L-LLR), Thin- Large Lateral Roots (T-LLR), Small Lateral Roots (SLR), couche d'endoderme (ed), cortex (c), sclérenchyme (sc), exoderme (ex) et épiderme (ep).

### III.1 Différences anatomiques entre les 3 types de racines latérales

Nous avons dans un premier temps décrit les différences anatomiques entre les différents types de racines latérales grâce à l'autofluorescence des parois (**Figure 7**). L'épiderme se distingue par la présence de poils racinaires. L'endoderme et l'exoderme sont également facilement reconnaissables grâce à l'extinction de la fluorescence visible au centre de leurs parois radiales. Chaque type de LR comprend donc une couche d'endoderme adjacente à la stèle et une couche d'exoderme adjacente à l'épiderme. Entre l'endoderme et l'exoderme se situe une couche non identifiée pour les SLR et plusieurs couches de tissus internes chez les LLR. Les L-LLR sont caractérisées par la présence de plusieurs couches d'outer-cortex facilement identifiables lors de la différenciation des aérénchymes et d'une couche de sclérenchyme localisée entre le cortex et l'exoderme. On reconnaît aisément les cellules du sclérenchyme en raison de leurs parois plus épaisses, leur petite taille et leur forme anguleuse. En fonction des échantillons prélevés, la couche de sclérenchyme des L-LLR est plus ou moins différenciée. Les T-LLR possèdent quant à elles deux couches centrales : la couche adjacente à l'exoderme qui présente des caractéristiques d'outer-cortex, et celle adjacente à l'endoderme qui s'apparente à la couche non identifiée visible également dans les SLR.

### III.2 Identification des tissus internes dans les différents types de racines latérales

Parmi les 8 anticorps identifiés à la suite du criblage, nous n'en avons retenu que trois dans la suite des analyses. Nous avons ainsi choisi les trois anticorps donnant des profils complémentaires permettant de distinguer les différents types de cortex et qui présentaient les profils les plus spécifiques. Les immunolocalisations des racines latérales ont été réalisées avec les anticorps M 14 (marquage de toutes les couches de cortex), M 133 et M 107 (marquage de l'outer-cortex et du sclérenchyme) (**Figure 8** et **Annexe 2**). Les anticorps M 107 et M 133 marquent toutes les couches entre l'endoderme et l'exoderme pour les trois types de racines latérales, signifiant donc que ces couches sont soit de l'outer-cortex soit du sclérenchyme. Ces couches sont identifiées grâce au marquage du M 14, qui marque exclusivement les cellules corticales. En effet, le double marquage M 14 avec le M 107 ou le M 133 permet d'identifier ces cellules comme du cortex, et plus précisément comme de l'outer-cortex. Ces résultats permettent donc de conclure quant à la nature de la couche jusqu'ici non identifiée des SLR comme une couche d'identité corticale, et également d'avancer qu'aucune racine latérale ne présente d'inner-cortex. Nous avons confirmé la présence d'une couche de sclérenchyme dans les L-LLR et son absence dans les T-LLR et SLR par coloration FASGA et par immunolocalisation avec l'anticorps M 150 spécifique du sclérenchyme. La coloration FASGA est un marqueur histochimique spécifique des tissus



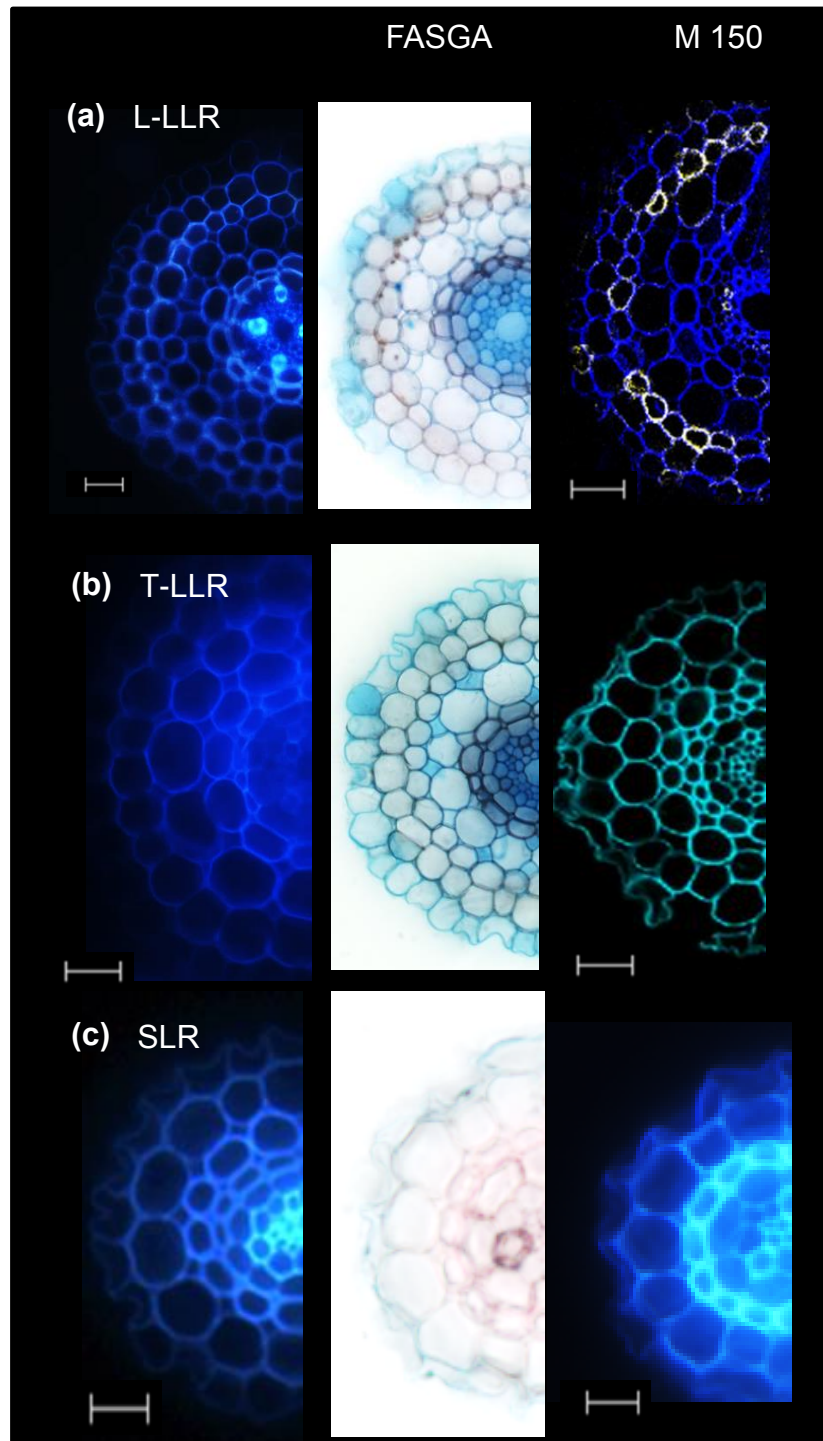
**Figure 8: Identification des tissus internes des SLR, T-LLR et L-LLR.**

Les immunolocalisations ont été réalisées sur des racines latérales prélevées sur des plantules cultivées 4 semaines en hydroponie. Les images sont réalisées à l'aide d'un microscope confocal et montrent la superposition d'une photo prise à 561 nm correspondant à la longueur d'onde du fluorochrome couplé à l'anticorps secondaire, et d'une photo prise sous UV permettant de visualiser l'autofluorescence de toutes les parois cellulaires. Chacun des trois anticorps M 14, M 107 et M 133 a été hybridé sur les trois types racinaires. Barres=20µm

Abréviations : Large- Large Lateral Roots (L-LLR), Thin- Large Lateral Roots (T-LLR), Small Lateral Roots (SLR), couche d'endoderme (ed), cortex (c), sclérenchyme (sc), exoderme (ex) et épiderme (ep).

lignifiés (Tolivia and Tolivia 1987), et permet ainsi la distinction du sclérenchyme et des faisceaux vasculaires par rapports aux autres tissus racinaires (**Figure 9**).





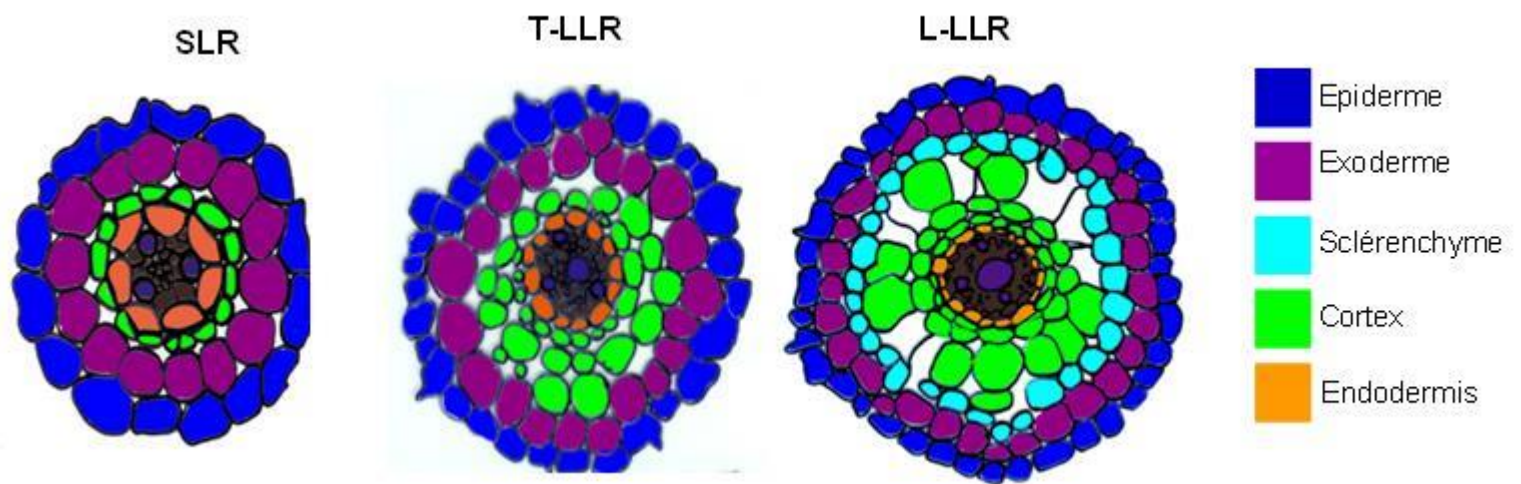
**Figure 9: Présence ou absence de la couche de sclérenchyme dans les SLR, T-LLR et L-LLR par coloration FASGA et immunolocalisation du marqueur M150.**

Pour chaque type de LR sont présentées une image de coupe radiale en autofluorescence (sous lumière UV), une coupe radiale colorée au FASGA (observée en lumière blanche) et une coupe radiale sur laquelle une immunolocalisation avec le M 150 a été réalisée. Ces images sont réalisées à l'aide d'un microscope confocal et montrent la superposition d'une photo prise à 561 nm correspondant à la longueur d'onde du fluorochrome couplé à l'anticorps secondaire, et d'une photo prise sous UV permettant de visualiser l'autofluorescence de toutes les parois des cellulaires. Barres=20µm

## Conclusion

Les marqueurs d'identité développés dans le cadre de cette étude ont permis de préciser l'organisation interne des racines séminales et de distinguer deux types de cortex dans ces racines: l'inner et l'outer-cortex. Ces marqueurs ont également permis de définir l'organisation tissulaire des racines latérales du riz (**Figure 10**), avec un marquage plus précis que les colorations histochimiques. Aucune de ces racines ne possède d'inner-cortex, ce qui est assez surprenant pour les L-LLR, qui semblent avoir une organisation très proche de racines séminales. Cependant leur diamètre est moins important, ce qui confirme bien l'existence d'une corrélation entre le nombre de couches de cortex et le diamètre racinaire. Cette étude a également permis d'identifier la couche centrale des SLR comme de l'outer-cortex. Cette couche avait auparavant été décrite comme du sclérenchyme à plusieurs reprises (Lux, Luxova et al. 2004; Rebouillat, Dievart et al. 2009), ou comme du cortex par une étude japonaise (Kono, Igeta et al. 1972). Les anticorps pariétaux se présentent donc comme un nouvel outil, rapide et facile d'usage, pour l'analyse des anatomies racinaires. Ils pourront être utilisés dans le but d'identifier et de différencier les tissus corticaux dans des mutants racinaires (cf. Chapitre 2. 1.1.2). De plus, les composants des parois cellulaires étant communs à toutes les cellules végétales (Rose 2003), le protocole de criblage des anticorps pariétaux pourrait être transposé à d'autres organes ou d'autres espèces afin d'identifier d'autres marqueurs tissu-spécifiques.

La couche d'inner-cortex décrite dans cette étude avait déjà été caractérisée chez une espèce de riz sauvage (Yang, Zhang et al. 2014) comme la couche de cortex la plus interne et plus lignifiée. Ce terme est également retrouvé dans la description de tissus subcorticaux chez le maïs (Baluška 1995) où il désigne la couche de cortex formant des aérenchymes. Dans cette même étude le terme outer-cortex désigne la couche de cortex lignifiée ayant un rôle de soutien, qui correspondrait à la couche de sclérenchyme chez le riz. Chez *A.thaliana* cette couche est appelée middle-cortex. Ces données mettent en avant la nécessité de définir les termes utilisés pour décrire les tissus internes, qui ne sont, à ce jour régis par aucune règle. Nous avons proposé d'utiliser les termes d'inner et d'outer-cortex pour les deux types de cortex présents dans les racines de riz, en raison de leurs positions anatomiques respectives (Henry, Divol et al. 2016). La formation de la couche de « middle-cortex » d'*A.thaliana* est bien décrite dans la littérature. Elle serait formée à partir d'une division tardive d'une cellule d'endoderme (Baum, Dubrovsky et al. 2002; Paquette and Benfey 2005). L'existence de ce tissu chez deux espèces distantes de 150 Ma sur le plan évolutif pose la question de son rôle dans la physiologie et le développement racinaire. Des études récentes ont apporté des précisions sur sa fonction, sa formation et la régulation de sa mise en place chez *A.thaliana*. Cette couche de cortex tardive serait impliquée dans la tolérance à divers stress abiotiques (Cui 2015), et sa mise en place dépendrait de l'activité de plusieurs gènes déjà connu pour leur implications dans la mise en place des tissus internes comme *SHR* et *SCR* (Koizumi, Hayashi et al. 2012). Nous connaissons l'existence de gènes orthologues chez le riz, appelés *OsSHR1&2* et *OsSCR1&2*. Cependant aucune information



**Figure 10: Schéma des anatomies racinaires des LR**



relative à leur implication dans la mise en place de ce tissu n'est disponible à l'heure actuelle. Nous avons donc décidé de remédier à ce problème en tentant d'identifier la fonction des gènes *OsSHR1* et *OsSHR2* dans la formation du cortex.

L'origine de la première cellule d'inner-cortex est encore peu claire. Il est actuellement impossible de trancher entre les deux hypothèses concernant sa formation : S'agit-il d'une division de cellule d'endoderme ou bien d'une division d'une cellule initiale ? Un travail est en cours au laboratoire pour définir l'origine de cette couche, avec notamment un projet de modélisation de la mise en place des tissus racinaires en collaboration avec l'équipe Virtual Plant dirigée par Christophe Godin (INRIA, Montpellier). La suite de notre étude concerne le contrôle moléculaire de la mise en place des couches de cortex chez le riz, en analysant la fonction des gènes *OsSHR1* et *OsSHR2* orthologues au gène *AtSHR* d'*A.thaliana*, dans la formation du cortex et des autres tissus racinaires chez le riz.



## **CHAPITRE II**

# **Mécanismes moléculaires de la mise en place du cortex**

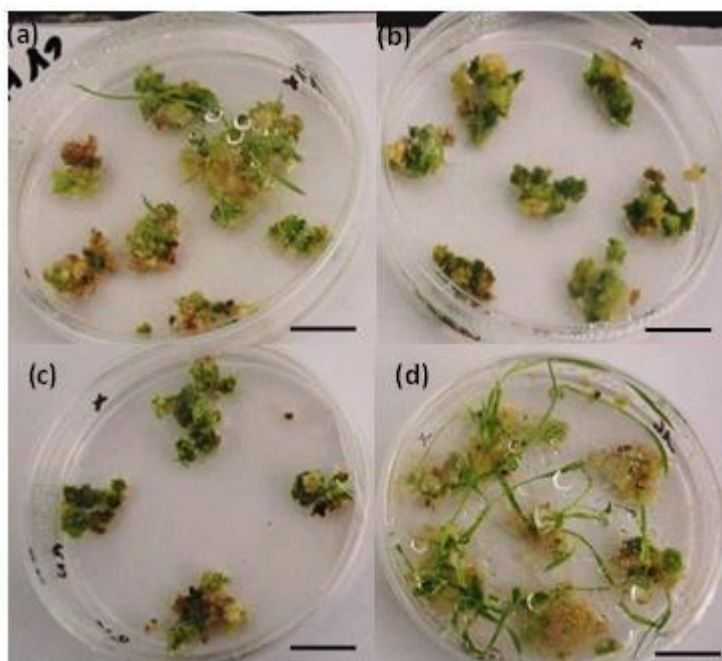


## Introduction

Les tissus internes racinaires de riz et d'*A.thaliana* sont formés au niveau des méristèmes racinaires (RAM). Chez *A. thaliana*, le rôle clef du couple de facteurs de transcription *SHR/SCR* dans la régulation des divisions des cellules initiales générant ces tissus, a été mise en évidence par (Nakajima, Sena et al. 2001). En se basant sur le travail réalisé chez *A. thaliana*, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de formation du cortex chez le riz, et à l'implication des deux orthologues *OsSHR1&2* dans cette mise en place. Ont-ils un rôle dans la formation de ce tissu ? Et si oui lequel ? Ont-ils un rôle équivalent ?

La thèse de Germain Pauluzzi portait sur l'analyse fonctionnelle des gènes *SCR* et *SHR* dans le développement racinaire du riz. Pour cela, des lignées de plantes transgéniques surexprimant les gènes *OsSHR1&2* ont été produites. Des analyses préliminaires ont établi que ces plantes avaient de nombreuses couches surnuméraires de tissus internes ; qu'il semblait exister un retard/déficit de régénération des cals transformés ; et que toutes les plantes surexprimeurs étaient stériles. Nous sommes repartis de ces résultats préliminaires pour les approfondir, en ajoutant le gène *AtSHR* d'*A.thaliana* dans nos analyses.

- Quelle est l'origine des problèmes de régénération observés lors de la surexpression ?
- Quelle est l'identité des couches surnuméraires observées lors de la surexpression des gènes *SHR* ?
- Quel est le rôle respectif d'*OsSHR1* et *OsSHR2* dans la formation des tissus racinaires ?



**Figure 1 : Retard de régénération des cals transformés.**

Cals après 25 jours de régénération. Construits surexprimeurs OsSHR1 (a), OsSHR2 (b), AtSHR (c) et vecteur vide (d). Barres=1,5cm.

**Tableau 1 : Classes phénotypiques des lignées surexprimeurs.** Les cases grisées ne sont pas représentées par aucune plante. Nodule correspond à une racine très épaisse qui ne pousse pas en profondeur, elle forme une grosse protubérance sous le plateau de tallage.

PHENOTYPE									
diamètre racinaire	épaisse 1			fines 2			mix fines + épaisses 3		
orientation racines/ partie aérienne	touffe a	app. Développé b	app. Développé+ feuilles enroulées c	touffe a	app. Développé b	app. Développé+ feuilles enroulées c	touffe a	app. Développé b	app. Développé+ feuilles enroulées c
tortueuses A									
droites B									
mix droites+tortueuses C									
nodules D									
pas de racine-touffe E									

## I. La surexpression des gènes *SHR* engendre la formation de couches surnuméraires de cortex

Nous avons produit de nouvelles lignées surexprimeurs (overexpressed lines : OE) d'*OsSHR1&2* en ajoutant une lignée surexprimant *AtSHR*. Nous avons mené une analyse des plantes produites et étudié leurs impacts sur la régénération et sur le développement racinaire.

Chez *A.thaliana*, nous savons que la surexpression du gène *AtSHR* engendre la formation de couches surnuméraires décrites d'abord comme de l'endoderme (Helariutta, Fukaki et al. 2000; Nakajima, Sena et al. 2001), puis récemment identifiées comme des couches d'identités mixtes ou d'identités corticales (Wu, Lee et al. 2014). La question est donc de vérifier si la surexpression des protéines SHR induit également des couches surnuméraires et de mettre en évidence d'éventuelles différences entre les lignées surexprimeurs *SHR1*, *SHR2* et *AtSHR*.

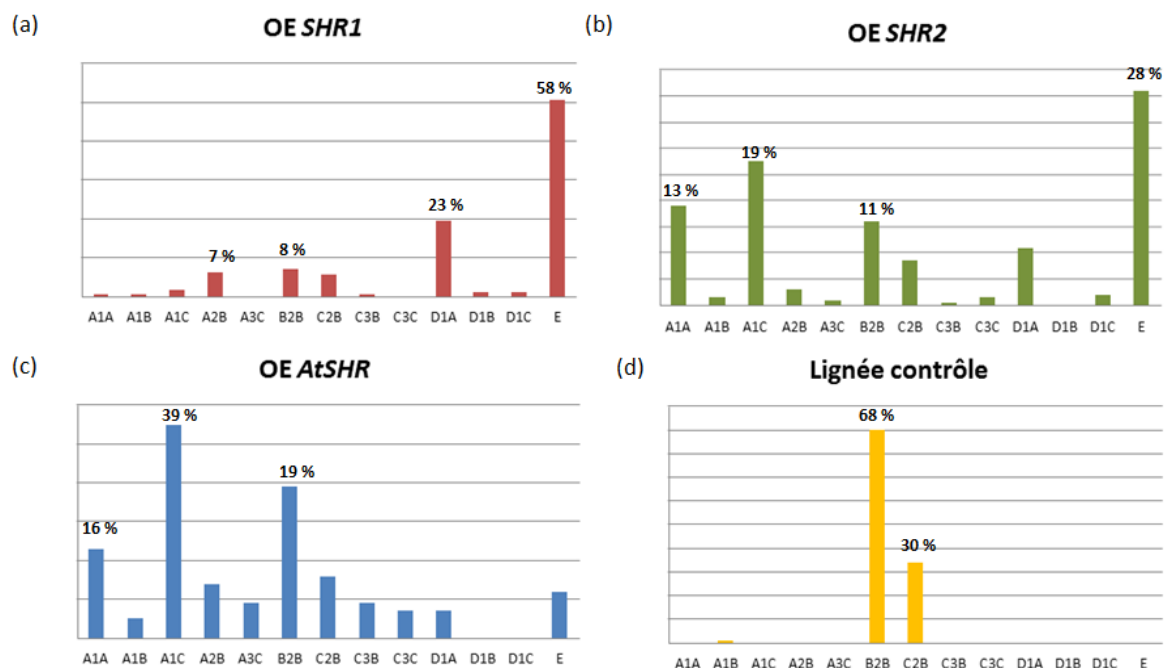
La transformation génétique des lignées transgéniques a été obtenue par co-culture de cals embryogènes de riz avec *Agrobacterium tumefaciens*. Ces bactéries contiennent un plasmide (pCAMBIA 5300) comprenant les cDNA des gènes *OsSHR1*, *OsSHR2* et *AtSHR*, qui ont été clonés en aval du promoteur de l'ubiquitine du maïs. Plusieurs transformations successives ont été réalisées au cours de l'hiver 2013 afin d'anticiper les problèmes de régénération. Les lignées transgéniques ont été analysées en génération T0 en raison de la stérilité des plantes surexprimeurs observée ultérieurement.

### I.1. Phénotypage des lignées transgéniques

Deux transformations génétiques ont été réalisées générant un total de 916 plantes : une transformation classique (pour laquelle les bactéries transformées sont appliquées directement sur des cals embryogènes) et une transformation directe (pour laquelle les bactéries transformées sont appliquées directement sur des grains). Chacune des transformations comprenait les trois constructions surexprimeurs (OE *SHR1*, OE *SHR2* et OE *AtSHR*) ainsi qu'un plasmide contrôle, le vecteur pCAMBIA 5300 seul.

#### I.1.1 Phénotypage macroscopique des lignées transgéniques

Le suivi des cals transformés a permis de mettre en évidence une différence entre les trois construits. Dès le stade de régénération, lorsque les cals sont transférés du milieu sélectif NBS au milieu RN permettant la régénération de feuilles et de racines, nous avons remarqué que les trois construits contenant les gènes surexprimés présentaient un retard d'environ 3 semaines par rapport au contrôle (**Figure 1**). Pendant les deux premières semaines le verdissement des cals était homogène entre les construits. Au-delà de trois semaines apparaissent les premiers organes (tiges et racines) chez le contrôle, tandis que les cals surexprimeurs semblaient être bloqués à ce stade de « verdissement ». Après cinq semaines, plus de 900 cals en cours de régénération ont été passés en tube (262 plantes

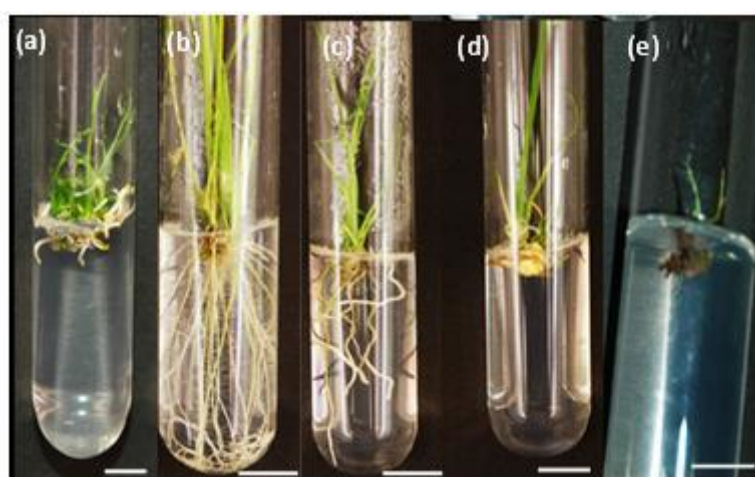


**Figure 2 : Classes phénotypiques des plantes surexprimeurs**

Répartition des 173 plantes *OE SHR1* (a), 290 plantes *OE SHR2* (b), 262 plantes *OE AtSHR* (c) et les 132 plantes contrôle vecteur vide (d).

**Tableau 2 : Réduction des classes phénotypiques des lignées surexprimeurs en 5 classes.**

Classes	A	B	C	D	E
<b>Phénotypes</b>	<b>Grosses racines</b> Appareil aérien plus ou moins développé (touffe ou feuilles surenroulées)	Racines et feuilles normales Phénotype semblable au <b>WT</b>	<b>Mix de</b> phénotypes	Racines de type <b>nodules</b> Appareil aérien très peu développé	Plantes mortes sans système racinaire et Appareil aérien très réduit (touffe)



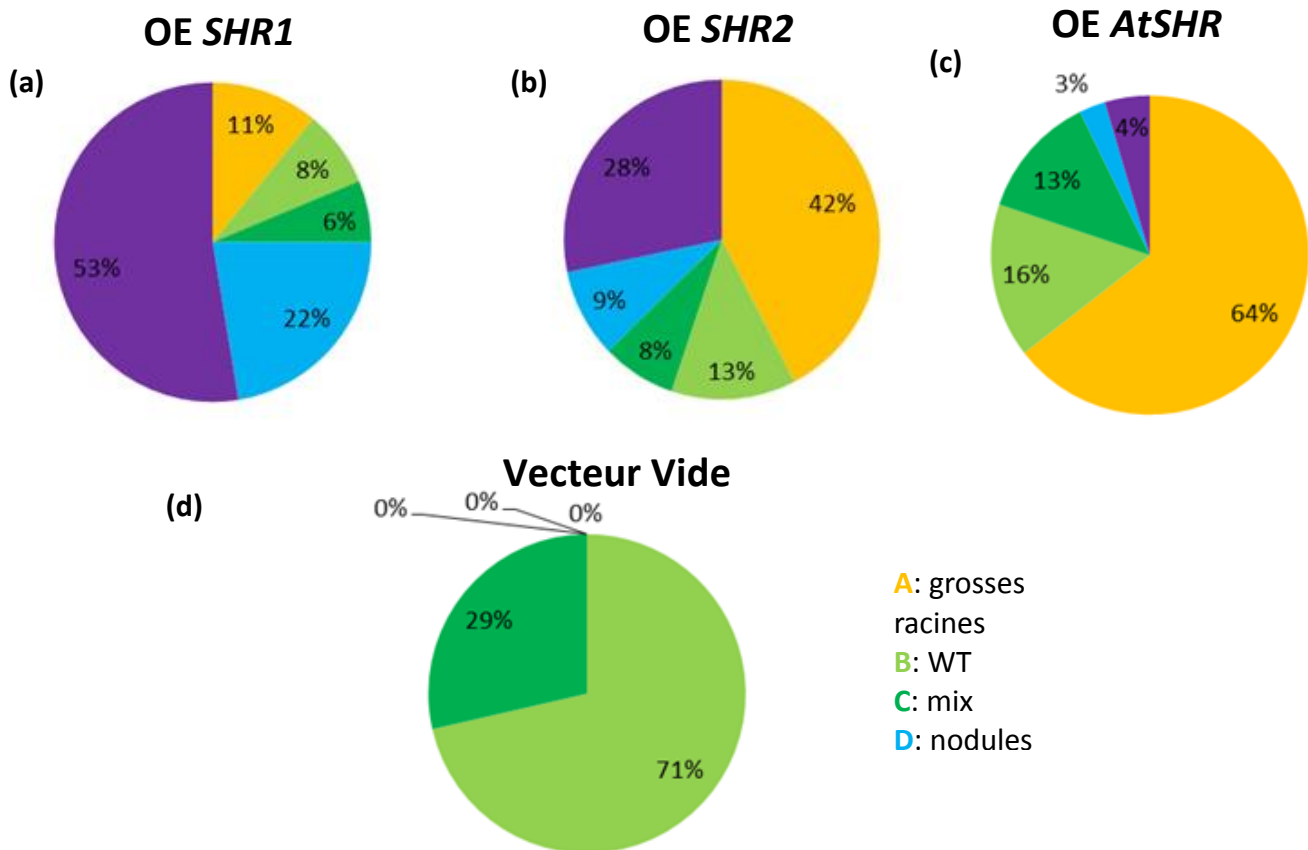
**Figure 3 : Photo des plantes régénérées après 3 semaines en tube. Classes A (a), B (b), C (c), D (d), E (e). Barres=1cm**



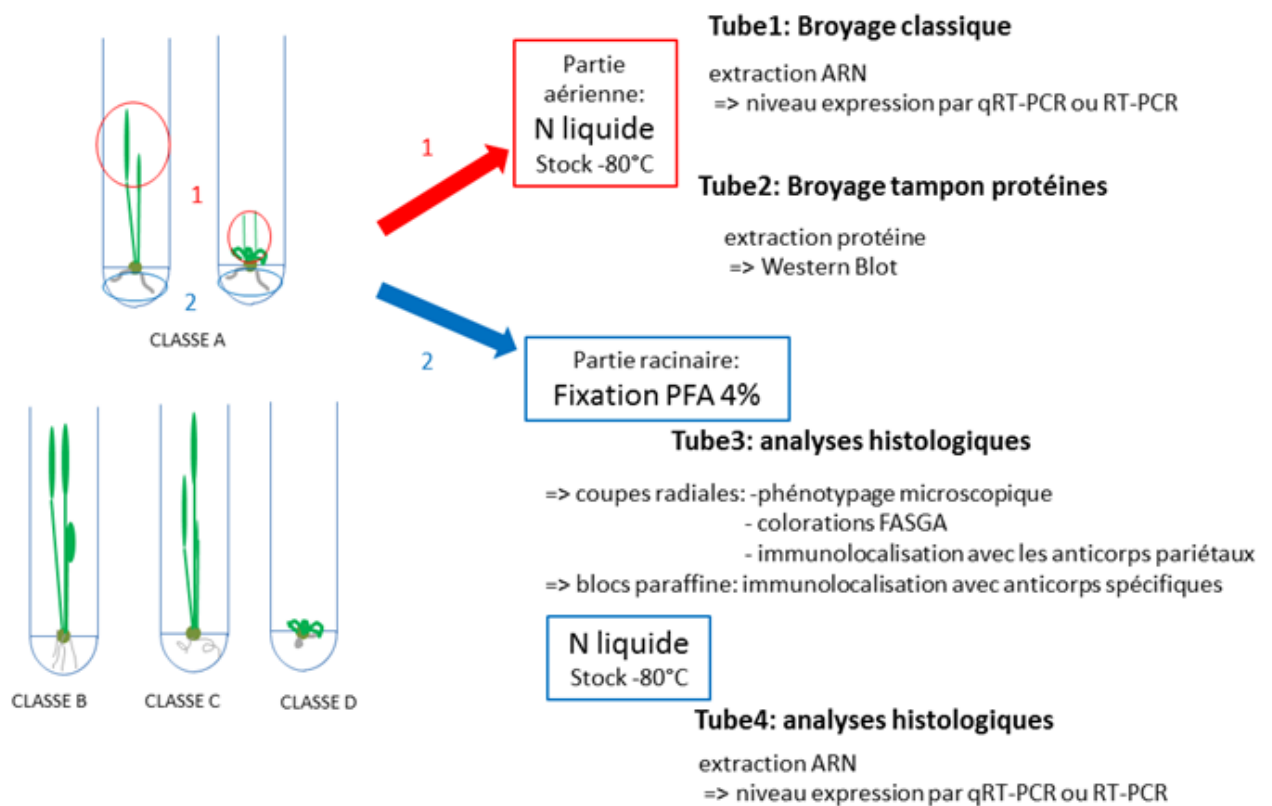
pour *AtSHR*, 173 pour *OsSHR1*, 290 pour *OsSHR2* et 96 pour le contrôle). Nous avons alors suivi les plantules individuellement et remarqué qu'elles avaient un taux de régénération très faible comparé au contrôle. Seulement 27% des cals ont généré des plantules pour les plantes surexprimeurs *OsSHR1*, 43% pour *OsSHR2*, et 40% pour *AtSHR* contre 95% pour le contrôle. En observant la régénération des cals, nous avons remarqué trois tendances majeures : la plupart des cals restent bloqués en cours de régénération sans être capable de former ni racine ni tige (53% pour OE *SHR1*, 28% pour OE *SHR2* et 4% pour *AtSHR*), la deuxième partie des cals régénère en formant soit des plantes à phénotypes normaux (semblables au contrôle) soit des plantes à racines épaisses. Afin de pouvoir quantifier ces effets, un phénotypage détaillé a été réalisé sur toutes les plantes en tube. Pour cela 24 classes ont été établies, permettant de relier un phénotype racinaire (épaisseur des racines, tortuosité, ..) à un phénotype aérien (enroulement des feuilles, appareil aérien réduit...). Ces classes sont présentées dans le **Tableau 1**. Les résultats du phénotypage montrent que les lignées *OsSHR2* et *AtSHR* ont des répartitions assez similaires comparées à *OsSHR1*. En effet, la majorité des plantes générées (**Figure 2 b, c, d**) ont des racines plus épaisses, tortueuses couplées à un appareil aérien formé de feuilles surenroulées (A1C) ou à un appareil aérien très peu développé (A1A), ou présentent des phénotypes sauvages (B2B). Ces lignées se distinguent d'OE *SHR1* pour laquelle plus de 60% des plantes n'ont pas survécues (classe E), ou forment des nodules racinaires (classe D) (**Figure 2 a**). Il semble que la surexpression des trois gènes *SHR* ralentisse/affecte l'étape de régénération, mais que de surcroît, la surexpression d'*OsSHR1* induise un véritable blocage de la régénération et/ou que sa surexpression soit toxique. Ce construit présente une surreprésentation des phénotypes forts (classes D et E majoritaires) comparée aux construits OE *SHR2* et *AtSHR*, qui sont constitués principalement de plantes à racines larges (classe A, respectivement 64% et 42%). Dans le but de faciliter les interprétations, nous avons réduit le nombre de classes phénotypiques à 5, basées uniquement sur les critères racinaires (**Tableau 2** et **Figure 3**). Nous avons constaté que la surexpression des trois gènes *SHR* engendre l'apparition de racines plus épaisses. Cela pourrait signifier que ces trois gènes ont tous un rôle dans l'établissement des tissus racinaires. Ce phénotypage soulève donc deux questions majeures :

- Les racines formées sont-elles de même nature chez les trois construits?
- La variabilité des phénotypes observés (classe A, C, D, E) est-il dû à une différence de niveau d'expression ?

Pour répondre à ces deux questions nous avons échantillonné dix individus de chaque classe pour chacun des construits. Au cours de cet échantillonnage nous avons prélevé la partie aérienne qui a été utilisée pour l'analyse moléculaire du niveau d'expression et la partie racinaire qui a été fixée pour des analyses histologiques et chimiques (**Figure 4**).



**Figure 4 : Répartition phénotypique des plantes surexpressseurs OE *SHR1* (a), OE *SHR2* (b), OE *AtSHR* (c) et le vecteur vide (d) en 5 classes principales.**

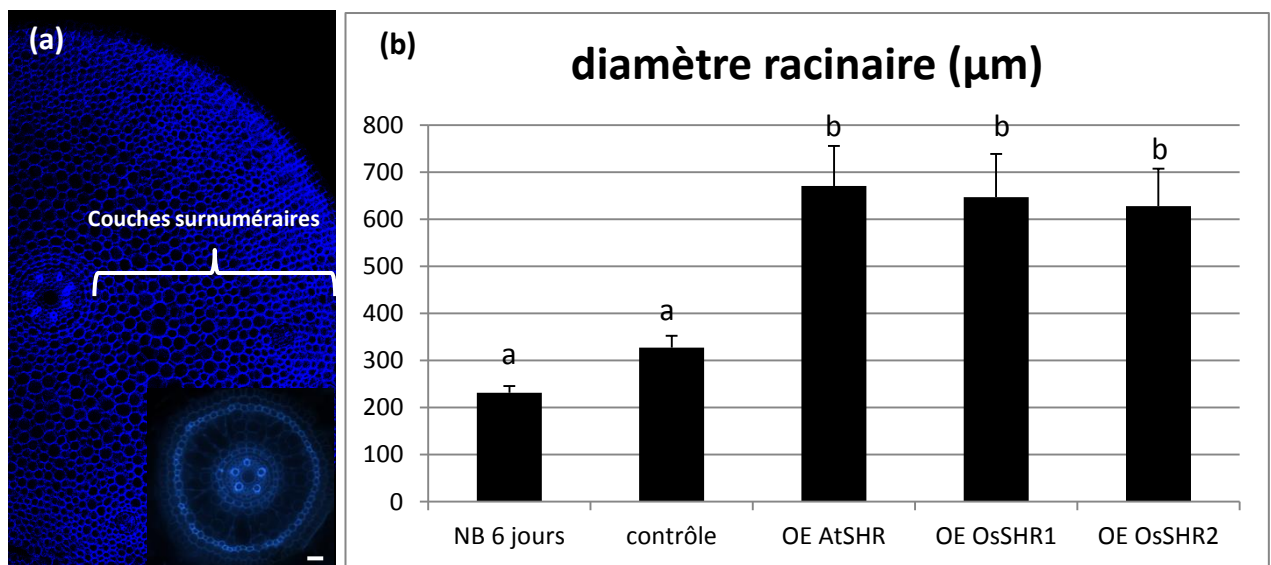


**Figure 5 : Schéma de l'échantillonnage des plantes surexpressseurs**

### I.1.2 Phénotypage microscopique des racines

Afin de comparer les organisations racinaires pour les trois construits, des coupes radiales au vibratome ont été réalisées sur des individus présentant des racines épaisses (classe A) (**Figure 5**). Nous avons observé un nombre très important de couches surnuméraires responsables de l'épaississement de la racine en accord avec les résultats de Germain Pauluzzi (**Figure 6 a**). En effet, le diamètre racinaire est doublé chez les plantes surexprimeurs (670,3  $\mu\text{m}$  pour les coupes OE *AtSHR*, 646  $\mu\text{m}$  pour OE *SHR1* et 628  $\mu\text{m}$  pour OE *SHR2*) comparé à celui des plantes contrôle (327  $\mu\text{m}$ ) (**Figure 6 b**). Afin d'identifier la nature de ces couches nous avons utilisé différentes techniques, telles que les colorations histologiques et les marquages immunohistochimiques. La coloration FASGA permet de mettre en évidence les tissus fortement lignifiés (faisceaux vasculaires, sclérenchyme) (Tolivia and Tolivia 1987), tandis que la berbérine colore la subérine dans les cadres de Caspary présents dans l'endoderme et l'exoderme (Cai, Chen et al. 2011) (**Figure 7**). Ces deux marqueurs histochimiques représentent des marqueurs d'identité indirects du sclérenchyme et de l'endoderme respectivement. Au cours de sa thèse, Germain Pauluzzi avait réalisé des colorations FASGA et berbérine sur des coupes radiales des surexprimeurs *OsSHR1* et *OsSHR2*. Aucune coloration des couches surnuméraires de ces lignées n'a été observée, excluant *de facto* une identité endodermale et sclérenchymateuse. Ce résultat suggérait, par élimination, une identité corticale de ces couches surnuméraires.

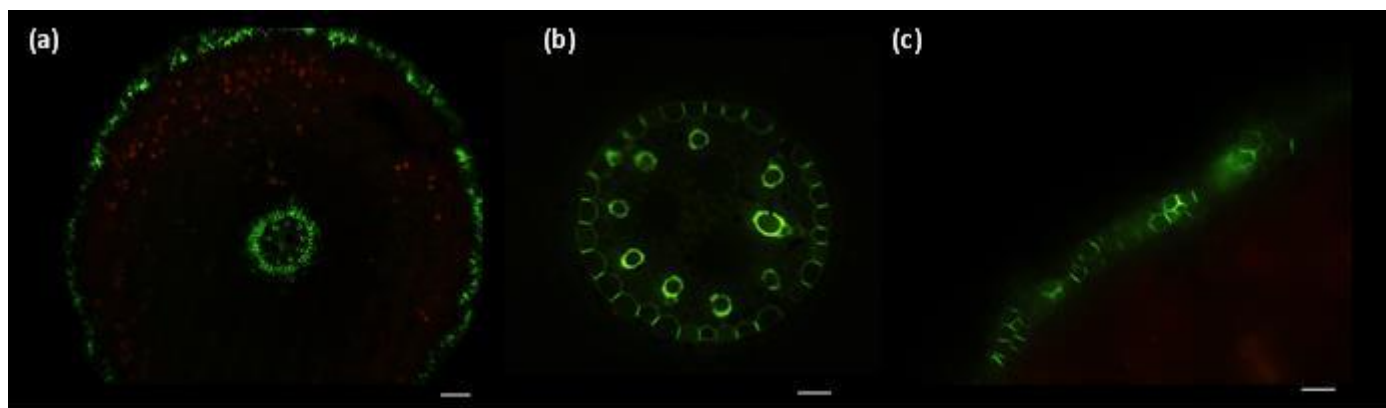
Nous avons donc réalisé des immunolocalisations avec les anticorps pariétaux présentés dans le premier chapitre de ce manuscrit ainsi que des colorations FASGA afin d'établir l'identité corticale de ces couches et de mettre en évidence d'éventuelles différences entre les différents construits. Nous avons utilisé les anticorps cortex-spécifique : le M 107 et M 133 qui marquent tous les tissus internes exceptés l'endoderme, l'inner-cortex et l'exoderme, et qui sont donc spécifiques de l'outer cortex ; et le M14 qui marque toutes les cellules de cortex au niveau du décollement des parois. Un quatrième anticorps a également été utilisé. Il s'agit du M 150, qui est spécifique du sclérenchyme (**Annexe 3**). Ces anticorps nous ont permis de conclure quant à la nature des couches surnuméraires résultant de la surexpression des gènes *SHR* : il s'agit de cortex. En effet, toutes les couches surnuméraires sont marquées par l'anticorps M 14 (**Figures 8**), quelle que soit la lignée OE *SHR*. De plus, les anticorps M 107 et M 133, spécifiques de l'outer-cortex, marquent la majorité des couches formées (**Figures 9 & 10**), voire l'ensemble des couches surnuméraires. Les couches non marquées par le M 133 et marquées par le M 14 sont donc de l'inner-cortex, elles se situent proche de l'endoderme. Sur les coupes observées, le nombre de couches d'inner-cortex est variable, pouvant aller de 0 (**Figures 9 g et 10 a**) à 8 couches (**Figures 10 d et f**). La surexpression des gènes *SHR* induit la formation de couches surnuméraires d'outer-cortex, mais aussi dans quelques cas d'inner-cortex. Nous avons également remarqué que ces surexprimeurs ne présentent qu'une seule couche d'endoderme (non marquée par le M107) (**Figure 9**), et que le marquage à l'aide du M 150 (confirmé par des colorations



**Figure 6 : Augmentation du diamètre racinaire des lignées surexpressseurs**

(a) Coupe radiale d'une racine de surexpressseur avec de nombreuses couches surnuméraires en autofluorescence, comparée à une coupe radiale de racine de *Nipponbare* âgée de 6 jours à la même échelle. Barre=20µm.

(b) Graphique illustrant l'augmentation du diamètre racinaire entre une racine *Nipponbare* de 6 jours (n=20), une racine de la plante contenant le vecteur vide (n=10) et les lignées surexpressseurs *AtSHR* (n=10), *OsSHR1* (n=8) et *OsSHR2* (n=8) (c). (student t-test , p-value <0.001)

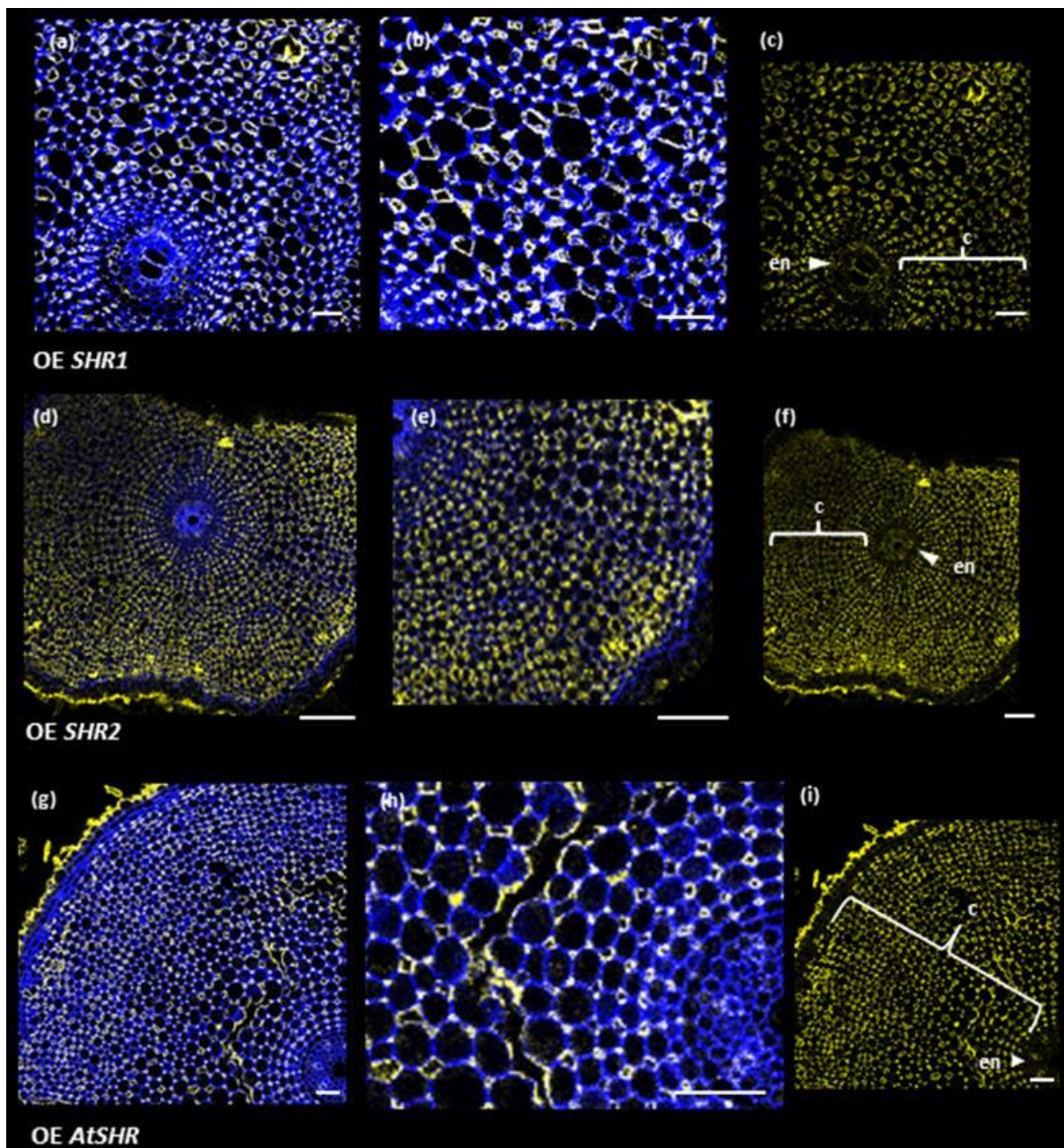


**Figure 7 : Révélation des cadres de Caspary de l'endoderme et l'exoderme des coupes radiales d'OE *SHR2* par coloration à la berbérine. Résultats de Germain Pauluzzi.**

(a) Coupe radiale d'une racine de surexpressseur OE *SHR2* marquée à la berbérine ; révélant l'endoderme et l'exoderme en vert et les tissus lignifiés en rouge. (b) Zoom sur la stèle où les cadres de Caspary et les faisceaux de xylèmes sont marqués. (c) Zoom sur la couche d'exoderme où sont marqués les cadres de Caspary. Barres=100µm

FASGA) révèle l'existence d'une seule couche de sclérenchyme chez ces surexprimeurs, qui peut être désorganisée dans certaines lignées (**Figure 11**).



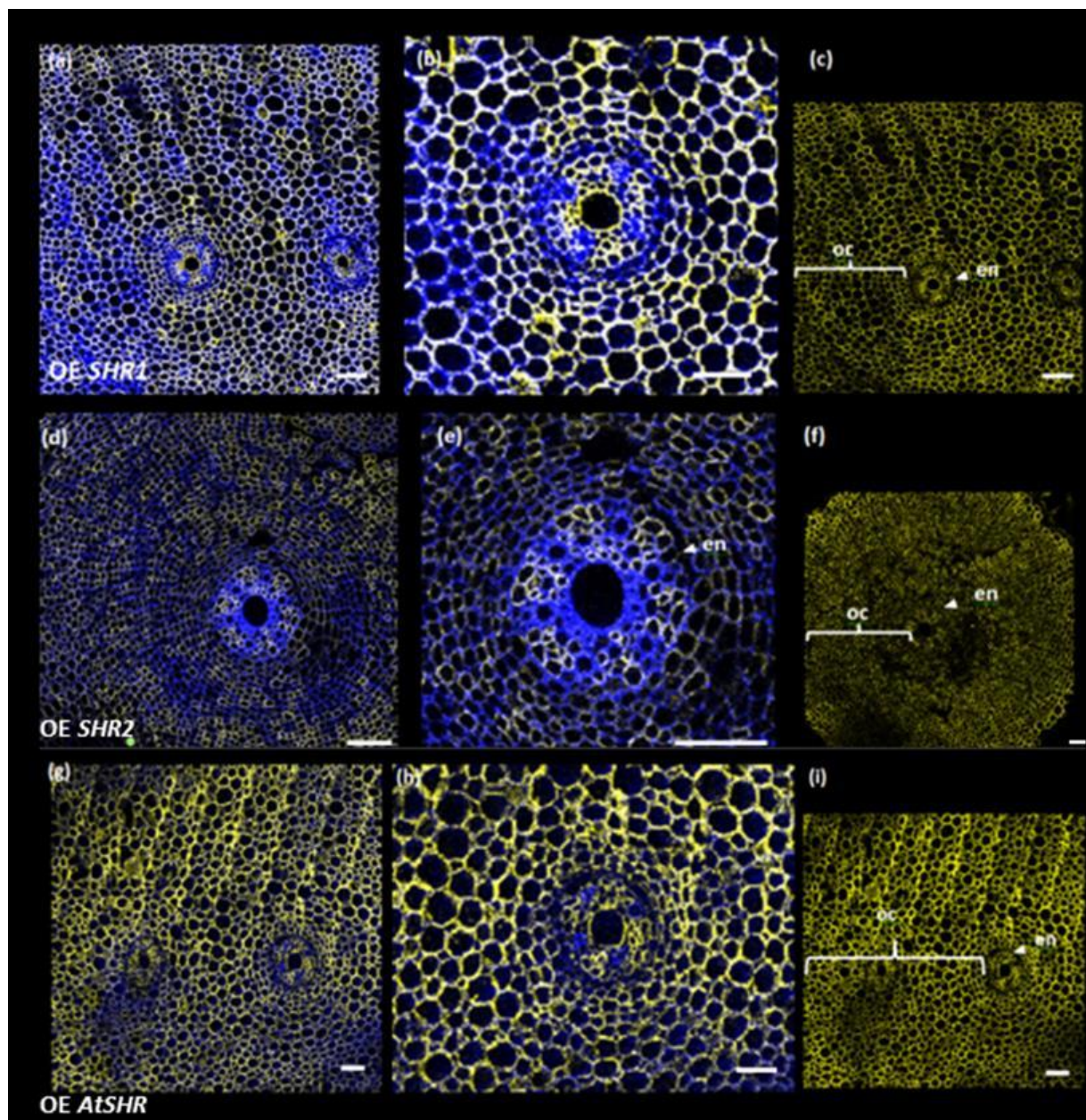


**Figure 8 : Immunolocalisation de coupes radiales de racines d'OE *SHR* avec l'anticorps cortex-spécifique M14**

Superposition d'images de coupes radiales de surexprimeurs *SHR* obtenues par utilisation d'un microscope confocal après immunolocalisation. L'autofluorescence des parois cellulaires est visible en bleu, en jaune figure le signal de l'anticorps pariétal. M14 marque les parois des cellules de toutes les couches de cortex, au niveau du décollement entre les cellules : les couches surnuméraires sont marquées. Barres=25µm

(a-c) Marquage de OE *SHR1* : (a) au 40x, (b) zoom sur les couches surnuméraires marquées et (c) marquage du de l'anticorps seul où une seule couche d'endoderme non marquée est visible. (d-f) Marquage de OE *SHR2* : (d) au 40x, (e) zoom sur les couches surnuméraires marquées et (f) marquage du de l'anticorps seul où une seule couche d'endoderme non marquée est visible. (g-i) Marquage de OE *AtSHR* : (g) au 40x, (h) zoom sur les couches surnuméraires marquées et (i) marquage du de l'anticorps seul où une seule couche d'endoderme non marquée est visible.



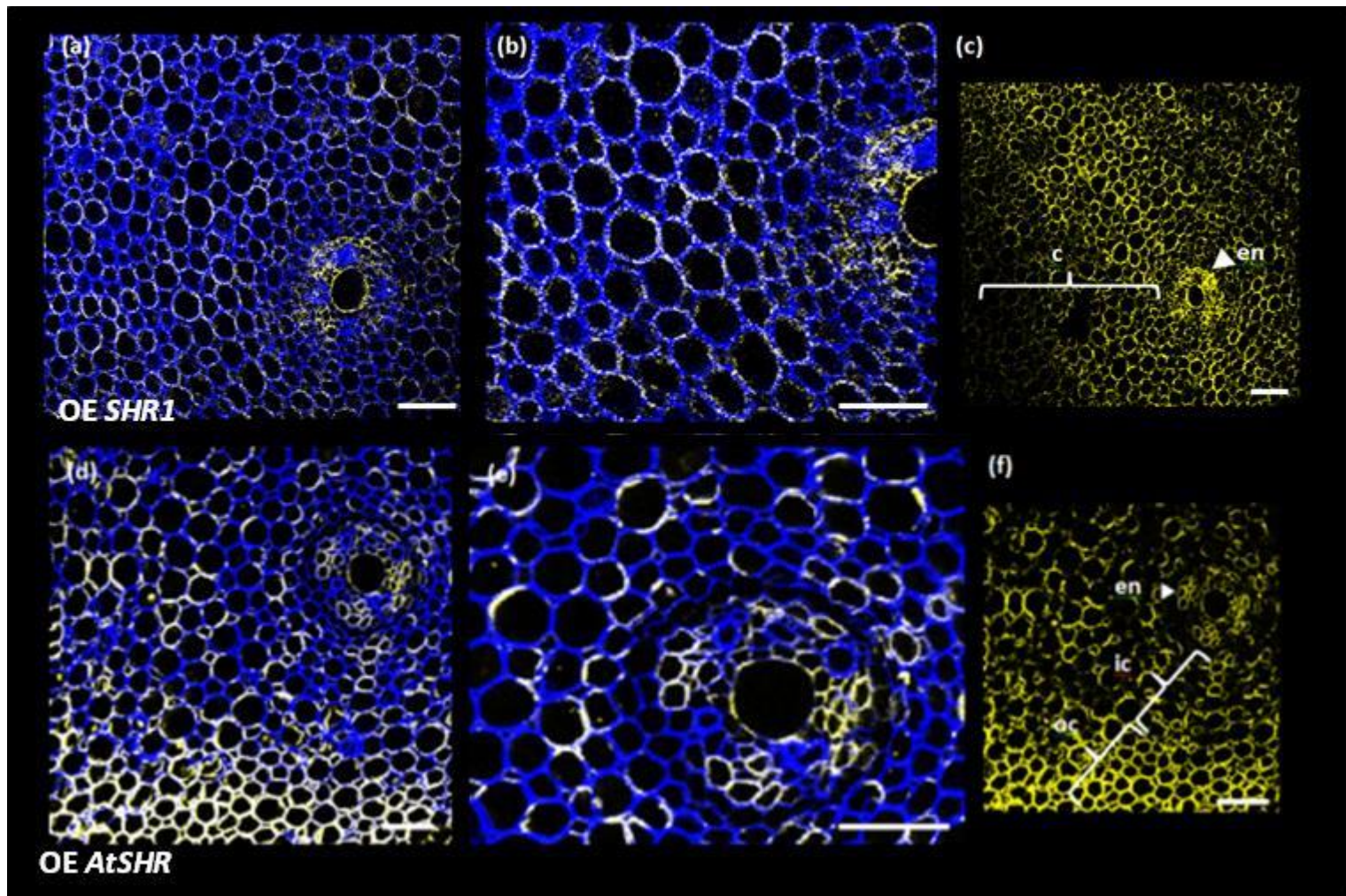


**Figure 9 : Immunolocalisation des OE *SHR* avec l'anticorps spécifique de l'outer-cortex M107**

Superposition des images de coupes radiales de surexprimeurs *SHR* obtenues par utilisation d'un microscope confocal après immunolocalisation. L'autofluorescence des parois cellulaires est visible en bleu, en jaune figure le signal de l'anticorps pariétal. M107 marque les parois des cellules de l'outer-cortex: les couches surnuméraires sont majoritairement marquées. Barres=25µm

(a-c) Marquage de OE *SHR1*: (a) au 40x, (b) zoom sur la stèle et (c) marquage de l'anticorps seul où une seule couche d'endoderme non marquée est visible, les couches surnuméraires d'outer-cortex sont marquées. (d-f) Marquage de OE *SHR2*: (d) au 40x, (e) zoom sur la stèle, (f) marquage de l'anticorps seul où on distingue les couches proches de la stèle non marquées d'endoderme et d'inner-cortex, des cellules marquées de l'outer-cortex. (g-i) Marquage de OE *AtSHR*: (g) au 40x, (h) zoom sur la stèle et (i) marquage de l'anticorps seul où une seule couche d'endoderme non marquée est visible, les couches surnuméraires d'outer-cortex sont marquées.





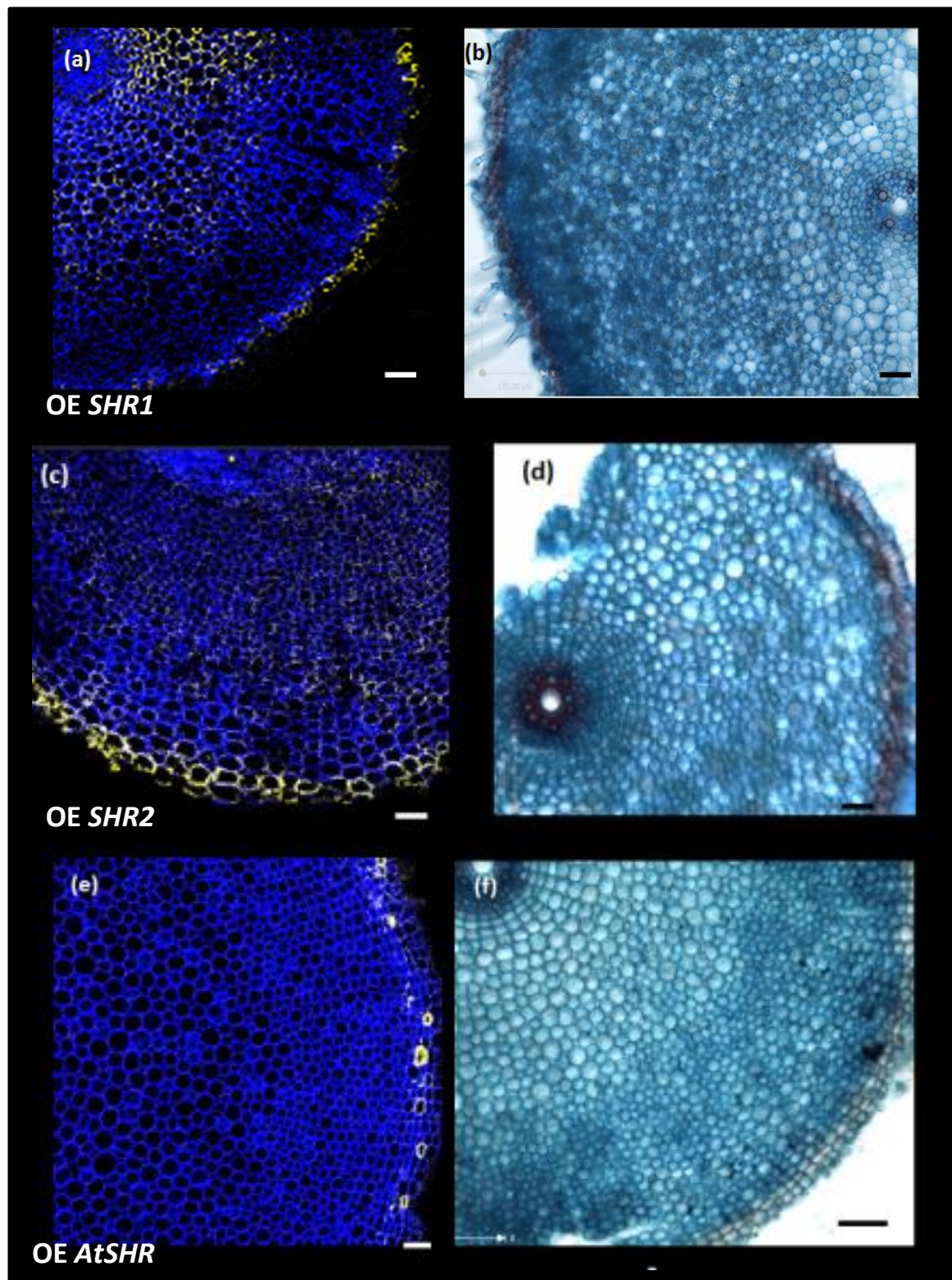
**Figure 10 : Immunolocalisation des OE *SHR* avec l'anticorps spécifique de l'outer-cortex M33**

Superposition d'images de coupes radiales de surexprimeurs *SHR* obtenues par utilisation d'un microscope confocal après immunolocalisation. L'autofluorescence des parois cellulaires est visible en bleu, en jaune figure le signal de l'anticorps pariétal. M33 marque les parois des cellules de l'outer-cortex: les couches surnuméraires sont majoritairement marquées. Barres=25μm

(a-c) Marquage de OE *SHR1*: (a) au 40x, (b) zoom sur la stèle et (c) marquage de l'anticorps seul où une seule couche d'endoderme non marquée est visible, les couches surnuméraires d'outer-cortex sont marquées.

(d-f) Marquage de OE *AtSHR*: (d) au 40x, (e) zoom sur la stèle, (f) marquage de l'anticorps seul où on distingue les couches proches de la stèle non marquées d'endoderme et d'inner-cortex, des cellules marquées de l'outer-cortex.



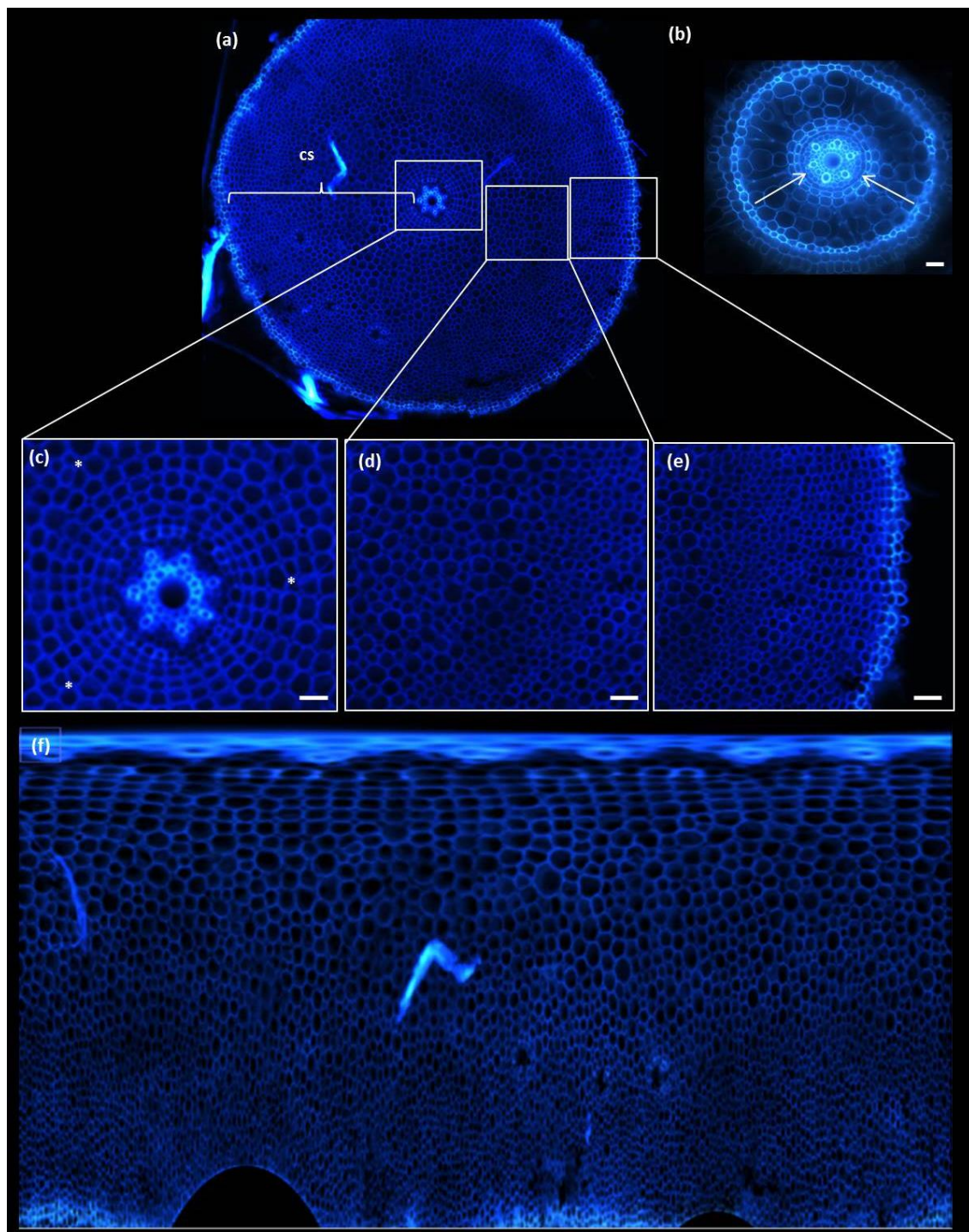


**Figure 11 : Immunolocalisation à l'aide de l'anticorps M 150 et coloration FASGA des OE *SHR* mettant en évidence la présence d'une couche de sclérenchyme**

Superposition d'images de coupes radiales de surexprimeurs *SHR* obtenues par utilisation d'un microscope confocal après immunolocalisation. L'autofluorescence des parois cellulaires est visible en bleu, en jaune figure le signal de l'anticorps pariétal. Le M150 marque les parois des cellules de sclérenchyme. Les images des coupes colorées au FASGA sont prises sous lumière blanche au 40x. Barres=25µm

(a-b) Marquage de OE *SHR1* : (a) Immunolocalisation avec le M150 au 40x et (b) coloration FASGA qui mettent en évidence une couche de sclérenchyme.





**Figure 12 : Augmentation du nombre de couches de cortex chez les surexprimeurs *SHR*.**

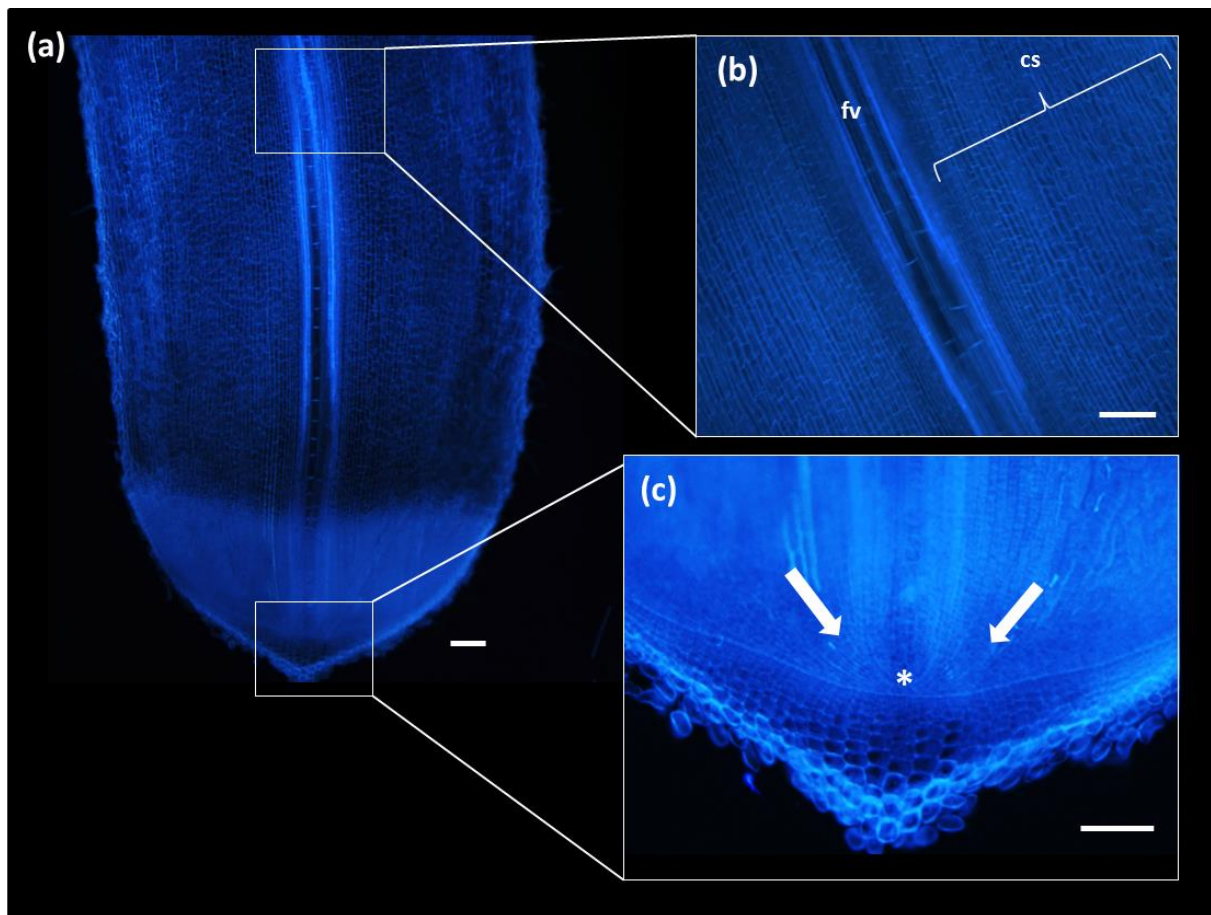
L'autofluorescence des parois est visible sous UV. Barres=25µm

(a) Coupe radiale d'un surexprimeur présentant un nombre très important de couches surnuméraires (cs). (b) Coupe radiale de racine séminale de *Nipponbare* âgée de 6 jours où les cellules de cortex sont alignées du sclérenchyme à l'endoderme. (c) Zoom sur la stèle de la coupe radiale d'une racine de surexprimeur, où des divisions anticlinales (\*) et péricleinales (\*) sont visibles dans le cortex. (d) Zoom sur la zone centrale de la coupe surexprimeur, où les cellules corticales sont plus petites et ne sont plus parallèles en raison des multiples divisions anticlinales. (e) Zoom sur la zone externe de la coupe surexprimeur, où les cellules corticales sont plus petites et non alignées en files comparativement à *Nipponbare*. (f) transformation en vue polaire de la coupe radiale de surexprimeur (outil PHIV Root-Cell développé sur ImageJ).

**Tableau 3 : Phénotypage des surexprimeurs *SHR***

Moyennes  $\pm$  écart type des différents critères pour des racines séminales de *Nipponbare* âgées de 6 jours (n=20), des racines des plantes contenant le vecteur vide (n=10) et les lignées surexprimeurs *AtSHR* (n=10), *OsSHR1* (n=8) et *OsSHR2* (n=8) (c). (student t-test , p-value <0.001 \*\*\*, p-value <0.005 \*\*). Les critères sont calculés sur des coupes radiales à l'aide du logiciel Volocity.

	Diamètre racinaire ( $\mu\text{m}$ )	Nombre de cellules d'Endoderme	Nombre de cellules de Cortex	Divisions periclinales de cellules d'endoderme	Divisions anticlinales de cellules d'endoderme
<b>NB 6 jours</b>	231.2 $\pm$ 14.22	25 $\pm$ 0.12	4.93 $\pm$ 0.36	0.5 $\pm$ 0.5	1.67 $\pm$ 0.75
<b>Contrôle</b>	327 $\pm$ 25	20.50 $\pm$ 2.6	4.5 $\pm$ 0.5	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1
<b>OE <i>AtSHR</i></b>	964.8 $\pm$ 85 ***	27.2 $\pm$ 3	29 $\pm$ 6 ***	0.4 $\pm$ 1	1.5 $\pm$ 1
<b>OE <i>SHR1</i></b>	646 $\pm$ 92 ***	26.56 $\pm$ 3.38	25.44 $\pm$ 5.63 ***	1 $\pm$ 1	1.56 $\pm$ 0.84 **
<b>OE <i>SHR2</i></b>	628 $\pm$ 79 ***	25.60 $\pm$ 2.88	30.60 $\pm$ 1.12 ***	0.75 $\pm$ 0.75	3 $\pm$ 1 **



**Figure 13 : Coupe longitudinale d'une racine OE *AtSHR*.** L'autofluorescence des parois visible sous UV. Barres=25μm. (a) Coupe longitudinale d'une racine OE *SHR* (au 10X). (b) Zoom sur la zone d'élongation de la racine, où les couches surnuméraires d'outer-cortex sont alignées parallèlement de part et d'autres des faisceaux vasculaires (au 20 X). (c) Zoom sur la zone méristématique où les couches de tissus internes convergent vers les cellules initiales (au 40X). L'orientation des couches est indiquée par les flèches blanches. Abréviations: couches surnuméraires (cs), faisceaux vasculaires (fv)

### I.1.3 Hypothèses sur la formation de ces couches surnuméraires de cortex

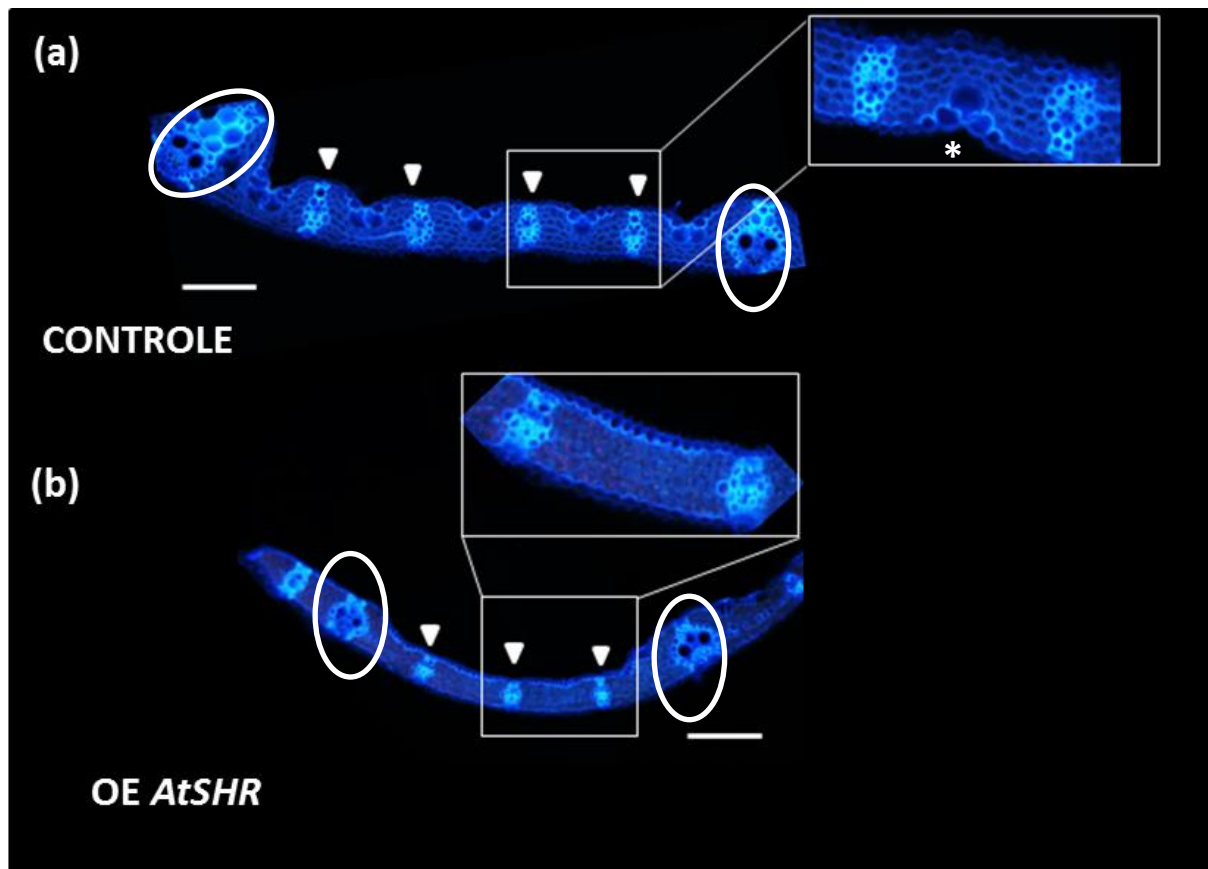
Les analyses phénotypiques (immunolocalisations, colorations FASGA, images de racines en autofluorescence) ont permis de mettre en évidence que la surexpression des gènes *SHR* (de riz ou d'*A.thaliana*) engendre la formation de couches surnuméraires de cortex. Nous savons que les tissus internes sont formés au niveau du méristème grâce aux divisions périclinales successives des CEEID (Common Initial Epidermis-Endodermis Daughter). Nous avons donc cherché quelle était l'origine de ces couches : s'agit-il de divisions périclinales surnuméraires des initiales au niveau du méristème ou bien s'agit-il de divisions tardives de cellules de l'endoderme ou du cortex ?

Lors de la réalisation des coupes radiales, nous avons remarqué que pour les trois lignées surexpresses, le nombre de couches de cortex était variable, pouvant être multiplié par 6, soit plus de 30 couches de cortex au lieu de 5 (**Figures 12 a & b, Tableau 3**). Le nombre de cellules d'endoderme ainsi que le nombre de divisions périclinales de ce tissu ne varient pas entre le contrôle et les lignées OE (**Tableau 3**). Seules les divisions anticlinales des cellules d'endoderme et les divisions du cortex sont significativement augmentées chez les surexpresses. On voit apparaître des divisions surnuméraires dans des couches de cortex plus âgées (proches du sclérenchyme) mais aussi dans les dernières couches formées (proche de l'endoderme) (**Figures 12 c, d, e**). On remarque la présence de ces divisions car les cellules du cortex ne forment pas de files rectilignes du sclérenchyme à l'endoderme comme chez la variété sauvage (**Figures 12 b et d**). Il y a une désorganisation des couches corticales avec un nombre très élevé de très petites cellules, probablement issues de divisions tardives (**Figure 12 c et d**). Ces divisions tardives produisent des cellules surnuméraires corticales, mais sont-elles les seules à l'origine de toutes ces couches surnuméraires formées ?

Afin de savoir si les couches surnuméraires d'outer-cortex sont bien produites à partir de divisions méristématiques, nous avons réalisé des coupes longitudinales de racines surexpresses (**Figure 13**). La visualisation longitudinale de la racine met en évidence l'orientation des couches surnuméraires, qui sont disposées parallèlement aux faisceaux vasculaires dans la zone d'élongation (**Figure 13 b**), et qui convergent vers le centre quiescent (**Figure 13 c**).

Il y aurait donc deux processus parallèles conduisant à la formation de ces couches surnuméraires de cortex : d'une part, la surexpression des gènes *SHR* augmenterait les divisions périclinales des initiales au niveau du méristème, engendrant ainsi une succession de formation de couches d'outer-cortex, et d'autre part, la présence ectopique de la protéine ou du transcrit *SHR* dans les racines pourrait induire des divisions anticlinales et périclinales tardives dans le cortex formé.





**Figure 14 : Architecture foliaire des surexprimeurs *SHR*.**

Les feuilles sont observées après décoloration dans l'éthanol 70% sous lumière UV. Les faisceaux vasculaires principaux sont entourés par un cercle blanc, les faisceaux secondaires sont indiqués par des triangles et les cellules bulliformes par une étoile. Barres=200µm.

(a) Coupe radiale d'une feuille de la lignée contrôle.

(b) Coupe radiale d'une feuille enroulée d'une lignée surexprimeur OE *AtSHR* où les cellules bulliformes ne sont plus visibles

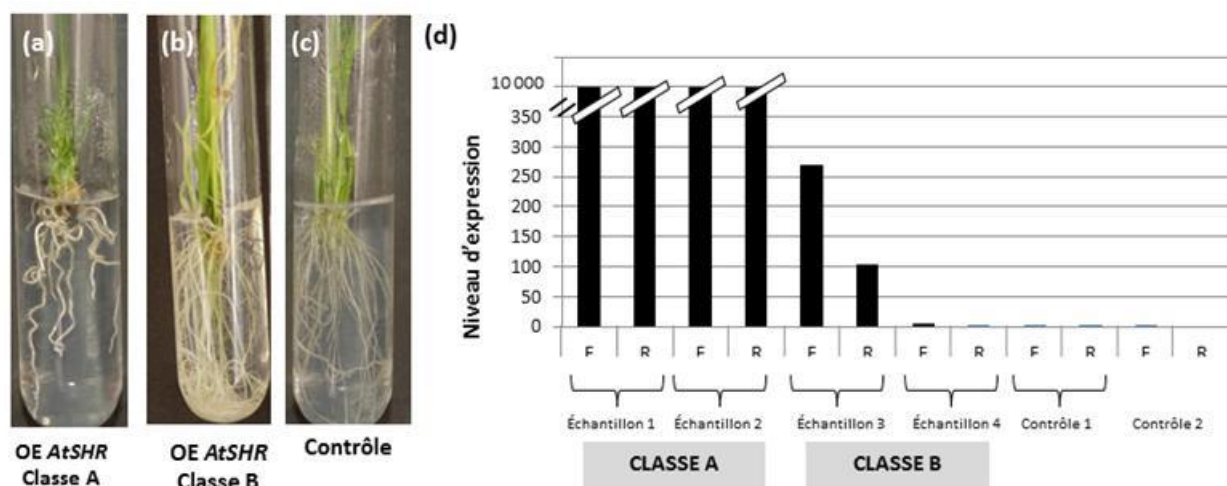
### I.1.4 Phénotypage microscopique des feuilles

L'étude des lignées surexprimeurs est surtout axée sur l'impact de la surexpression sur l'anatomie racinaire, mais le phénotypage des lignées en tube a aussi révélé des conséquences sur l'appareil aérien, avec un grand nombre de plantes (11% des OE *SHR1*, 42% des OE *SHR2* et 64% des OE *AtSHR*) présentant des feuilles enroulées ou des appareils aériens réduits. Ces phénotypes sont corrélés au caractère « grosses racines » (classe A). Des coupes histologiques de feuilles d'individus de classes A et B (phénotype WT) ont été réalisées pour les 3 lignées OE *SHR* et comparées avec la lignée contrôle (**Figure 14**). Ces analyses préliminaires révèlent que la surexpression des trois gènes *SHR* entraîne des modifications dans la structure foliaire, à savoir une diminution du nombre de faisceaux secondaires et une disparition des cellules bulliformes. Les cellules bulliformes présentes dans l'épiderme sont impliquées dans la réponse du riz au déficit hydrique. La turgescence des cellules bulliformes est dépendante de l'état hydrique de la plante et sa perte entraîne l'enroulement des feuilles. En cas de stress hydrique, ces cellules sont capables de perdre leur turgescence et de contracter ainsi l'épiderme de la feuille ce qui engendre l'enroulement des feuilles. Ce mécanisme est mis en place afin de diminuer les pertes en eau et de limiter la quantité d'énergie lumineuse reçue (Zhang, Wu et al. 2015). Le surenroulement observé des feuilles des lignées surexprimeurs est probablement dû à la disparition des cellules bulliformes. Ce résultat met donc en évidence, qu'en plus de jouer un rôle dans la formation du cortex racinaire, la surexpression des gènes *SHR* induit un changement d'identité des tissus de la feuille et semble réprimer la formation des cellules bulliformes.

### I.2 Corrélation entre phénotype et niveau d'expression des gènes *SHR* dans la plante

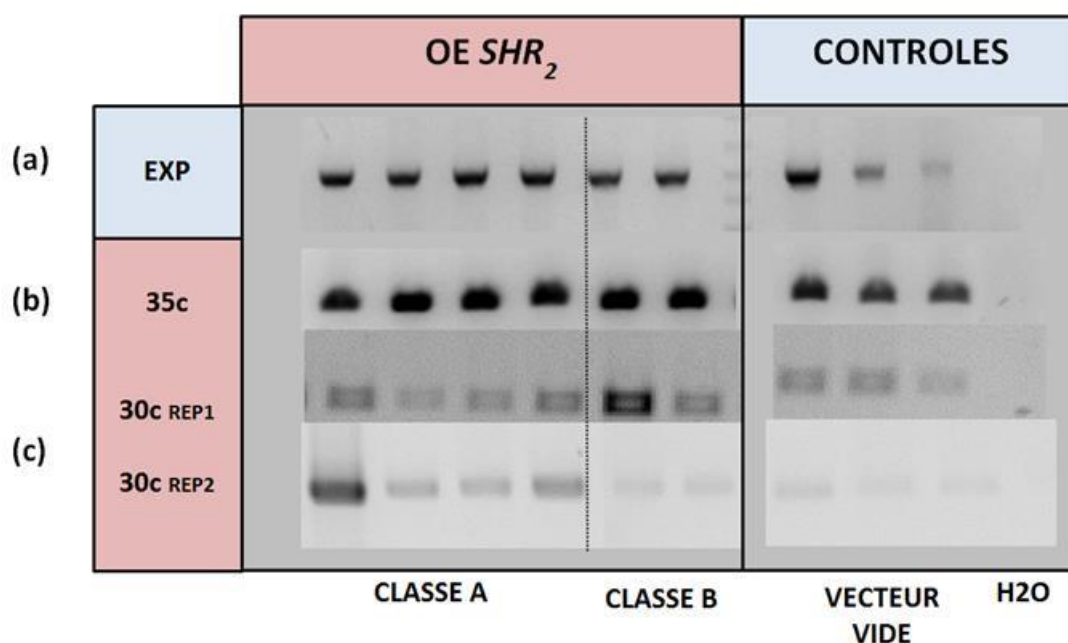
Pour établir une corrélation entre le niveau d'expression des gènes et les phénotypes observés, nous avons essayé d'évaluer le niveau de présence du transcrit pour une gamme de phénotypes variés. Nous nous attendions à observer le plus fort taux de transcrits chez les plantes à grosses racines (classe A et D) et un taux plus faible, proche de celui des plantes contrôle, chez les plantes ayant un phénotype normal (classe B). Pour la lignée OE *AtSHR*, nous nous attendions juste à une expression très forte chez les plantes transformées (graduelle selon la sévérité du phénotype) et une expression nulle chez les plantes contrôles puisque le gène n'est pas présent.

En raison de la forte homologie de séquences entre les gènes *SHR1* et *SHR2*, il était impossible d'identifier des couples de primers spécifiques de bonne efficacité pour la qRT-PCR. De plus, les seuls couples de primers spécifiques des gènes *SHR1* et *SHR2* se situent dans la partie 3'UTR des gènes, qui ne sont pas présentes dans les lignées surexprimeurs. Ces primers n'ont pu être utilisés que pour tester l'existence d'une auto-activation ou d'une



**Figure 15 : Corrélation entre phénotype et niveau d'expression du gène *AtSHR* dans les lignées OE *AtSHR*.**

(a) Echantillon de classe A avec des racines épaisses et tortueuses. (b) Echantillon de classe B avec un phénotype WT. (c) Echantillon contrôle (vecteur vide). (d) Graphique illustrant le niveau d'expression du gène *AtSHR* dans les feuilles (F) et racines (R) de plusieurs individus par classe par qRT-PCR (n= 2 répétitions).



**Figure 16 : Etude du niveau d'expression par RT-PCR de la lignée OE *SHR2* et des contrôles (vecteur vide et eau)**

(a) Amplification du gène de référence EXP (*Os06g111070*) à 35 cycles (Taq Diamond), effectuée pour vérifier la qualité des ADNC. (b) Amplification du gène *SHR2* à 35 cycles (Taq KOD Xtrem). (c) Un exemple de deux répétitions pour l'amplification du gène *SHR2* à 30 cycles (Taq KOD Xtrem), qui donnent des profils différents.



régulation croisée entre les gènes *SHR1* et *SHR2* endogènes (Chapitre 2 I.3). L'étude du niveau d'expression par qRT-PCR a pu être utilisée pour la lignée OE *AtSHR*, pour laquelle des couples de primers spécifiques étaient disponibles dans la littérature (Jia, Tian et al. 2015). En ce qui concerne l'étude du niveau d'expression des gènes *SHR* de riz, nous avons opté pour des RT-PCR.

### I.2.1 Analyse du niveau d'expression des gènes *SHR* dans les lignées surexprimeurs

- **Analyse de l'expression par qRT-PCR : surexpression mise en évidence pour la lignée OE *AtSHR***

Les qRT-PCR sur les lignées OE *AtSHR* ont été réalisées à l'aide de deux couples de primers spécifiques, en deux répétitions indépendantes. Dans les deux cas, *AtSHR* est surexprimé chez les plantes de la classe A (grosses racines) comparativement aux plantes de la classe B (phénotype WT) (**Figure 15**). Afin de savoir si le gène était plus exprimé dans la racine que dans la feuille, les analyses ont été menées sur les deux organes séparément, et ne révèlent aucune différence.

En conclusion, il existe bien une corrélation entre la sévérité des phénotypes et le niveau d'expression du gène *AtSHR* dans la plante : Les plus forts niveaux d'expression sont observés pour les échantillons de la classe A. Pour les plantes à phénotype WT, un niveau d'expression plus faible du gène a été mis en évidence, en opposition aux contrôles où l'expression est nulle.

- **Analyse de l'expression par RT-PCR des gènes *OsSHR1* et *OsSHR2* : impossibilité de conclure quant à leur surexpression**

Le niveau d'expression des gènes *SHR1* et *SHR2* chez les lignées OE correspondantes a été étudié par RT-PCR. En raison de l'existence d'un fort pourcentage de similarité (80%) entre les gènes *SHR1* et *SHR2*, il a été difficile d'identifier des couples de primers spécifiques pour chacun des gènes. De plus, l'amplification de ces amplicons n'a pu être réalisée qu'avec une enzyme polymérase spécifiquement développée pour les séquences récalcitrantes à l'amplification par PCR (KOD Xtrem, Invitrogen), telles que les séquences des gènes *SHR1* et *SHR2* qui présentent un fort pourcentage en GC. Pour chaque RT-PCR, nous avons voulu comparer les niveaux d'expression des plantes aux phénotypes forts (classe A) et phénotypes WT (classe B) avec les niveaux d'expression des plantes témoins (les plantes contenant le vecteur vide et la variété sauvage *Nipponbare*). Nous nous attendions à observer un niveau d'expression plus élevé pour les phénotypes de la classe A, sur la base des résultats obtenus avec les plantes surexprimeurs *AtSHR*.

Les profils d'expression observés ne sont pas corrélés à la sévérité des phénotypes observés (*i.e* le diamètre racinaire), c'est-à-dire que les expressions les plus fortes obtenues ne sont pas forcément retrouvées chez les échantillons de la classe A (**Figure 16**). De plus, les plantes appartenant à la même classe phénotypique ne montraient pas forcément le même

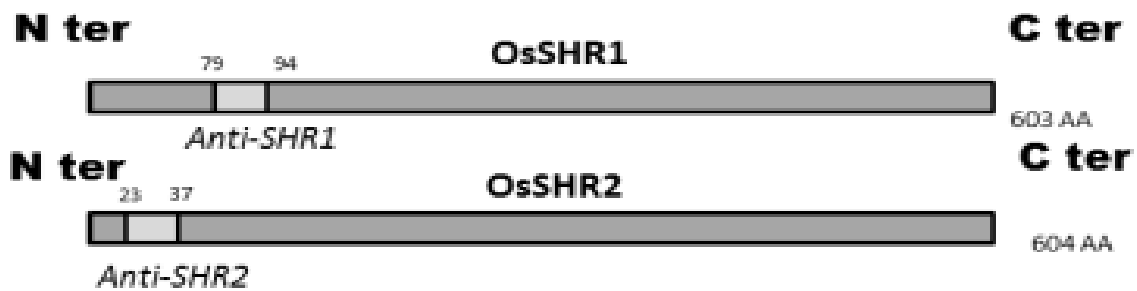


Figure 17 : Schéma des zones spécifiques ciblées par les anticorps OsSHR1&2

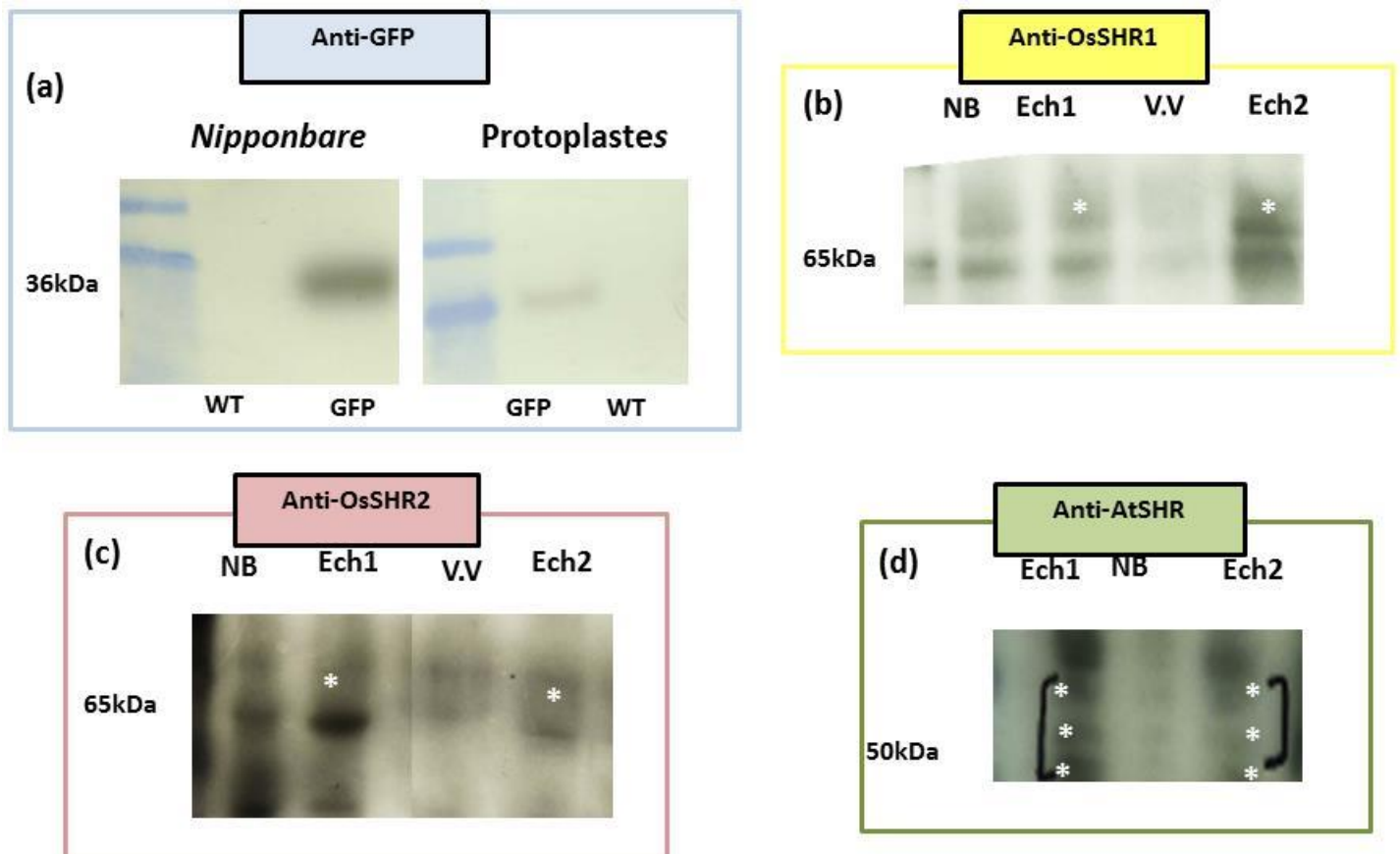


Figure 18 : Western Blot sur les lignées SHR

Les étoiles indiquent des bandes correspondant à des protéines candidates.

(a) Hybridation de l'anticorps commercial anti-GFP sur les extraits protéiques d'une lignée *pUBI:GFP*, ainsi que des protoplastes transformés par le même vecteur. Cet anticorps a été utilisé pour la mise en place de l'expérimentation.

(b) Hybridation de l'anticorps anti-OsSHR1, sur les contrôles (*Nipponbare* et vecteur vide VV) ainsi que deux échantillons de la classe A. Deux bandes présentent un léger différentiel entre les plantes transgéniques et le contrôle aux environs de 65kDa.

(c) Hybridation de l'anticorps anti-SHR2, sur les contrôles (*Nipponbare* et vecteur vide VV) ainsi que deux échantillons de la classe A. Deux bandes présentent un léger différentiel entre les plantes transgéniques et le contrôle aux environs de 65kDa.

(d) Hybridation de l'anticorps anti-AtSHR, sur le contrôle (*Nipponbare*) ainsi que deux échantillons de la classe A. Plusieurs bandes présentent un différentiel entre les plantes transgéniques et le contrôle aux environs de 50kDa.

niveau d'expression. A ces observations s'ajoute le problème que les PCR d'amplification des gènes *SHR* n'étaient pas reproductibles. Par exemple, pour deux PCR identiques (mêmes conditions) réalisées indépendamment sur des échantillons de la lignée OE *SHR2*, nous n'avons pas observé les mêmes profils d'expression (**Figure 16 c**). Un différentiel d'intensité des bandes est observé dans les deux cas, cependant il ne concerne pas les mêmes échantillons, et n'est pas corrélé à la sévérité des phénotypes. Ces observations sont également valables pour *SHR1* (**Annexe 4**). Nous ne pouvons donc émettre aucune conclusion. En plus des soucis de reproductibilité, aucune corrélation phénotype-niveau d'expression n'a pu être établie malgré les nombreuses conditions de PCR testées (nombre de cycles, quantité d'ADNc, durée d'amplification...). Nous ignorons à ce stade si cela est dû à un problème technique (problème d'amplification de gènes riches en bases GC) ou s'il n'existe aucune différence au niveau transcriptionnel entre les plantes des différentes classes. Les problèmes de reproductibilité que nous avons constatés ainsi que les résultats obtenus pour les lignées surexprimeurs *AtSHR* semblent néanmoins suggérer que le problème soit d'ordre technique.

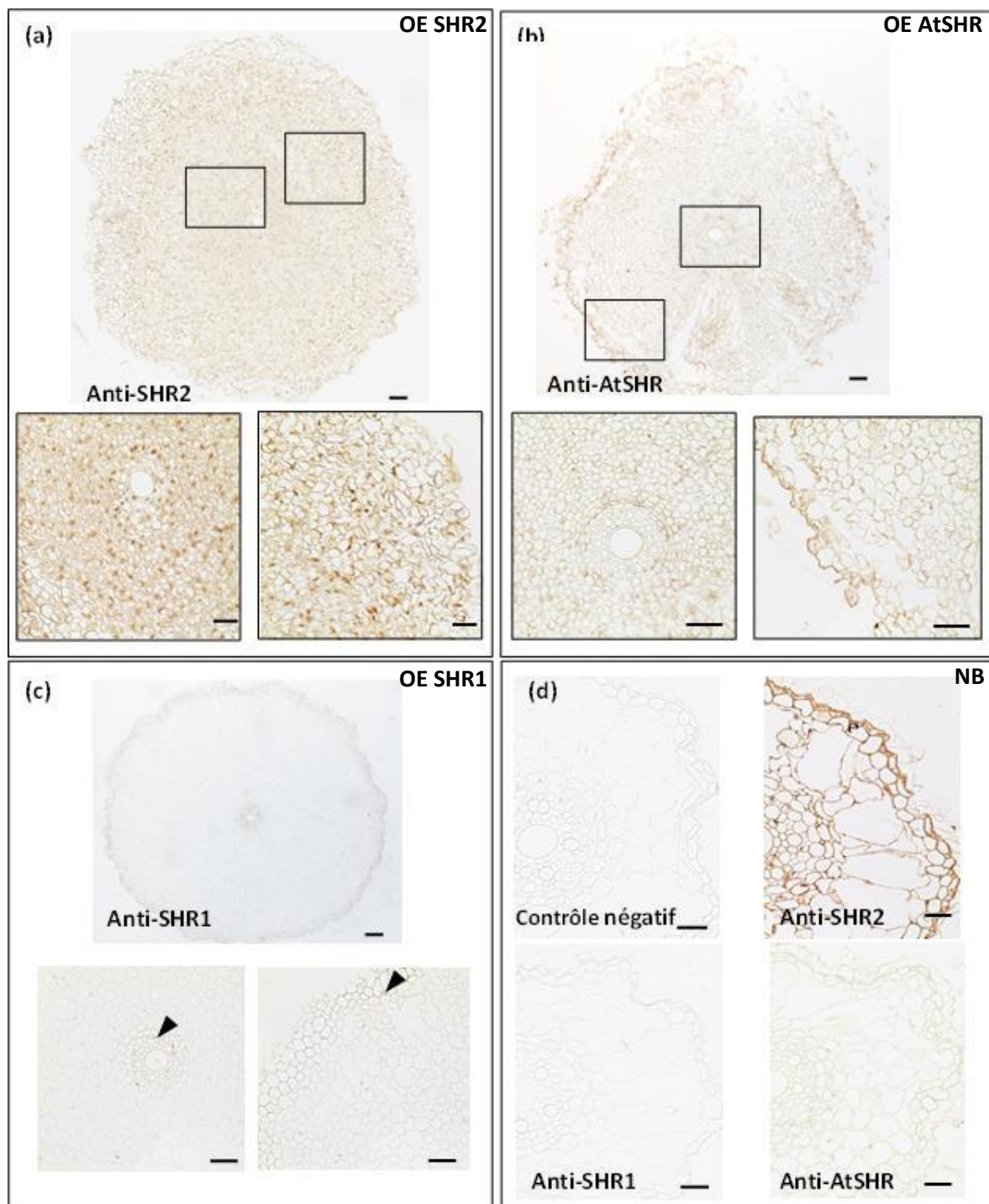
### 1.2.2 Analyse du profil d'expression des protéines SHR

Nous avons cherché à établir une corrélation entre les niveaux d'expression des protéines et les phénotypes observés. Pour cela nous avons utilisé des anticorps polyclonaux spécifiques aux protéines SHR1 et SHR2, qui ont été produits avant mon arrivée au laboratoire. Des peptides ont été dessinés dans la partie N-terminale des protéines, qui correspond à leur partie spécifique (la partie C-terminale correspondant au domaine GRAS conservé) (**Figure 17**), et plus particulièrement au niveau d'une zone de repliement (**Annexe 5**). L'anticorps Anti-AtSHR nous a été fourni par l'équipe de Malcom Bennett (Université de Nottingham). Nous ne connaissons pas sa séquence, mais nous savons que son utilisation a été validée en Western Blot et en immunolocalisation chez *A.thaliana*.

- **Validation des anticorps par Western Blot**

La première étape a été de chercher à valider la spécificité des anticorps par Western Blot. La technique de Western Blot a d'abord été optimisée à l'aide de plantes et de protoplastes transformés avec un plasmide permettant d'exprimer la protéine GFP et en utilisant un anticorps commercial Anti-GFP (Invitrogen). Ce dernier a permis de révéler la présence de la protéine GFP dans les plantes et les protoplastes transformés (**Figure 18 a**). Ensuite nous avons testés les anticorps purifiés anti-OsSHR1 (66,3kDa), anti-OsSHR2 (66,2kDa) et anti-AtSHR (53,5kDa) sur les lignées surexprimeurs et la lignée sauvage *Nipponbare*. Nous nous attendions à observer un différentiel d'intensité de la bande à la taille attendue entre les échantillons surexprimeurs de classe A et les contrôles (*Nipponbare* et/ou le vecteur vide).

Pour chacun des anticorps testés, plusieurs bandes sont visibles aux environs de 65kDa pour OsSHR1 (**Figure 18 b**) et OsSHR2 (**Figure 18 c**) et de 55kDa pour AtSHR (**Figure 18 d**)



**Figure 19: Immunolocalisation des lignées OE *SHR* et *Nipponbare*, avec les anticorps anti-SHR**

Révélation à la DAB. Barres=25μm. (a) Marquage d'une coupe radiale de racine d'échantillon OE *SHR2* x10 en haut, et zoom sur la stèle et les couches externes en x40 en bas. La protéine est présente dans les noyaux et le cytosol de toutes les cellules. (b) Marquage d'une coupe radiale de racine d'échantillon OE *AtSHR*. x10 en haut, et zoom sur la stèle et les couches externes en x40 en bas. La protéine est présente dans les noyaux de toutes les cellules. (c) Marquage d'une coupe radiale de racine d'échantillon OE *SHR1* x10 en haut, et zoom sur la stèle et les couches externes en x40 en bas. La protéine est présente dans les noyaux (flèches noires). (d) Marquage d'une coupe radiale de racine de *Nipponbare*. X40. Seul un marquage pour *SHR2* est obtenu, avec une localisation nucléaire dans les cellules de la stèle et des tissus internes, mais pas dans l'épiderme (ep).

Parmi les bandes visibles, celles présentant un différentiel d'intensité entre les contrôles et les échantillons surexpresses sont identifiées comme des bandes candidates. La difficulté d'identifier les bandes spécifiques est notamment due à un bruit de fond assez important. Malgré différentes optimisations (augmentation du temps de blocage, de la concentration de l'agent bloquant, du temps de rinçage...) nous n'avons pas réussi à améliorer les profils obtenus. Des lignées Knock-Out, que nous n'avons pas à notre disposition à ce moment-là, auraient pu faire office de contrôle négatif, et permettre ainsi l'identification des bandes spécifiques parmi les candidates. Ces lignées n'étaient en revanche pas nécessaires pour l'anticorps anti-AtSHR, puisque ce gène n'est pas exprimé dans le riz. Au final, les Western Blot d'AtSHR présentent un différentiel entre les échantillons surexpresses et le contrôle, mais plusieurs bandes sont visibles. Pour cet anticorps, il aurait fallu un extrait protéique d'une plante surexpresser *SHR* d'*Arabidopsis* qui aurait pu servir de contrôle positif. Pour conclure, nous n'avons pu valider la spécificité des anticorps anti-SHR par Western Blot, mais nous avons décidé de poursuivre les analyses en testant les anticorps par immunolocalisations directement sur des racines d'échantillons de classe A (racines larges) prélevés pour chacune des lignées surexpresses.

- **Immunolocalisation des anticorps SHR sur les racines de classe A**

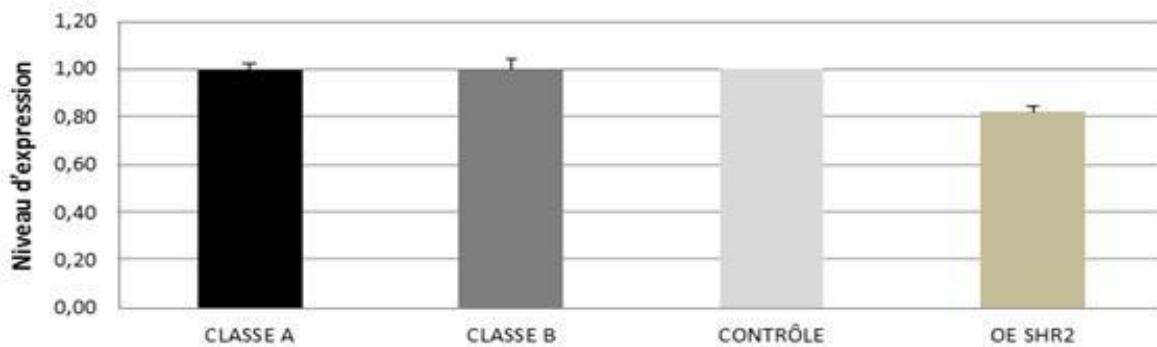
Les immunolocalisations ont été réalisées par l'entreprise Histalim, dans le cadre d'un projet commun établi avec l'équipe DAR. Elles ont été effectuées sur des coupes radiales de racines d'échantillons surexpresses de la classe A et de *Nipponbare*, fixées en paraffine au préalable. Avant de commencer les immunolocalisations avec les anticorps spécifiques, la qualité des échantillons a été vérifiée par marquage des racines avec des anticorps contrôles dirigés contre des protéines de ménage (anticorps dirigés contre l'actine et l'appareil de Golgi). Les marquages attendus ont été obtenus pour *Nipponbare* et les trois lignées OE, avec néanmoins un marquage plus faible observé pour la lignée OE *SHR1* (**Annexe 6**).

Les immunolocalisations des surexpresses par les anticorps spécifiques révèlent la présence des protéines SHR dans tous les tissus racinaires. Une localisation nucléaire et cytosolique est observée pour SHR2 et seulement nucléaire pour AtSHR et SHR1 (**Figures 19 a, b et c**). Un signal très faible est observé pour SHR1 qui pourrait être expliqué par l'utilisation d'un linker dans le procédé de révélation. En effet, les hybridations pour les anticorps SHR1 et AtSHR ont nécessité l'utilisation d'un linker pour la révélation à la 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Le multimètre HRP permettant la révélation à la DAB utilisé par Histalim ne reconnaît que les anticorps synthétisés dans le lapin ou la souris, alors que les anticorps AtSHR et SHR1 ont été produits dans le mouton et le rat.

Les immunolocalisations des coupes radiales de *Nipponbare* n'ont pas donné de signal pour l'anticorps anti-SHR1. En revanche, l'immunolocalisation de SHR2 a bien donné un signal, et elle permet de localiser l'expression de la protéine en condition normale : SHR2 est exprimée dans le noyau et le cytosol des cellules de la stèle et dans le noyau des cellules des tissus internes. Aucun signal n'est retrouvé dans l'épiderme (**Figure 19 d**).

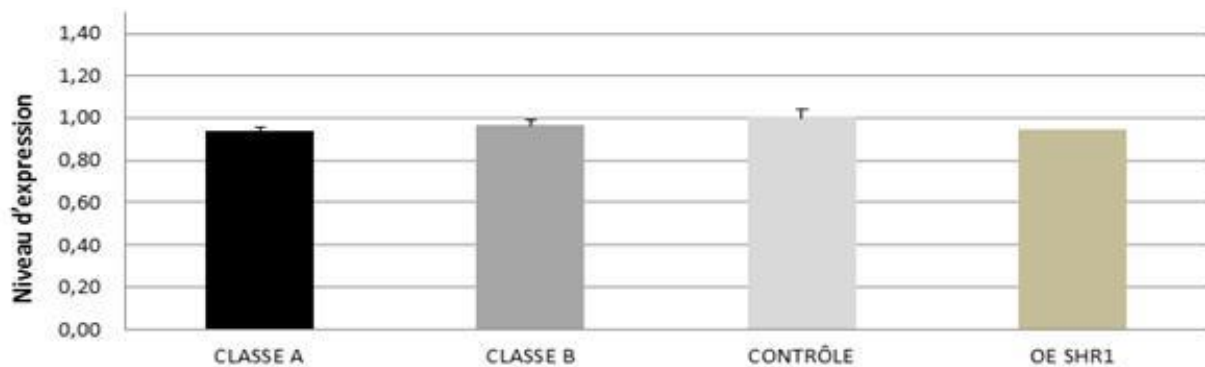
(a)

### Niveau d'expression de *SHR1* endogène



(b)

### Niveau d'expression de *SHR2* endogène



**Figure 20 : Niveaux d'expression des *SHR* endogènes dans les lignées OE**

qRT-PCR réalisées sur les échantillons OE et contrôles avec les primers endogènes localisés dans le 3'UTR des gènes *SHR*. (n=2 répétitions).

(a) Niveaux d'expression de *SHR1e* entre des échantillons surexpresseurs *SHR1* de différentes classes, le contrôle vecteur vide et un surexpresseur *SHR2*. Le niveau d'expression de *SHR1e* est constant entre les échantillons de référence et les OE. (Classe A n=5, classe B n=4, contrôle n=5, OE *SHR1* n=2)

(b) Niveaux d'expression de *SHR2e* entre des échantillons surexpresseurs *SHR2* de différentes classes, le contrôle vecteur vide et un surexpresseur *SHR1*. Le niveau d'expression de *SHR2e* est constant entre les échantillons de référence et les OE. (Classe A n=4, classe B n=4, contrôle n=5, OE *SHR2* n=2).



Ces immunolocalisations nous permettent de confirmer que les lignées OE *AtSHR* et OE *SHR2* sont bien des lignées surexprimant les protéines ; ce qui confirme les résultats mis en évidence par qRT-PCR pour la lignée OE *AtSHR*. La surexpression du gène *SHR1* n'est en revanche toujours pas démontrée de façon formelle. Le fait qu'on n'ait observé qu'un signal très faible chez la lignée surexpresseur et les anticorps contrôles et une absence de signal chez *Nipponbare* pourrait être expliqué par la mauvaise qualité des échantillons testés ou par la non-spécificité de l'anticorps anti-*SHR1*. Des analyses supplémentaires sont donc nécessaires pour conclure quant aux immunolocalisations à l'aide de cet anticorps. Toutefois, nous avons pu observer la présence de la protéine *SHR2* dans tous les tissus internes et la stèle chez *Nipponbare*. La comparaison de ce résultat avec la localisation du transcrit, nous permettra de conclure sur la mobilité de *OsSHR2*.

### I.3 Régulation des *SHR* et réseau de gènes

#### I.3.1 Etude de la régulation des gènes *SHR* (auto-activation et régulation croisée)

Nous savons à présent que les gènes *OsSHR1* et *OsSHR2* sont capables d'induire la formation de couches surnuméraires de cortex. Dans le but d'approfondir nos connaissances sur le fonctionnement de ces deux gènes, nous avons étudié pour chaque lignée surexprimeurs l'expression des deux gènes endogènes.

Seule la partie codante des gènes est surexprimée dans les lignées OE *SHR*. Il est donc possible de différencier l'expression des gènes endogènes (*SHR1e* et *SHR2e*) des gènes surexprimés grâce à des primers spécifiques localisés dans le 3'UTR. Nous avons cherché à savoir si *SHR1*, *SHR2* voire *AtSHR* étaient capables de modifier l'expression de *SHR1e* ou *SHR2e*, et donc de savoir si les gènes *SHR* étaient capables de contrôler leur propre expression (auto-activation) ou l'expression de son co-orthologue (régulation croisée).

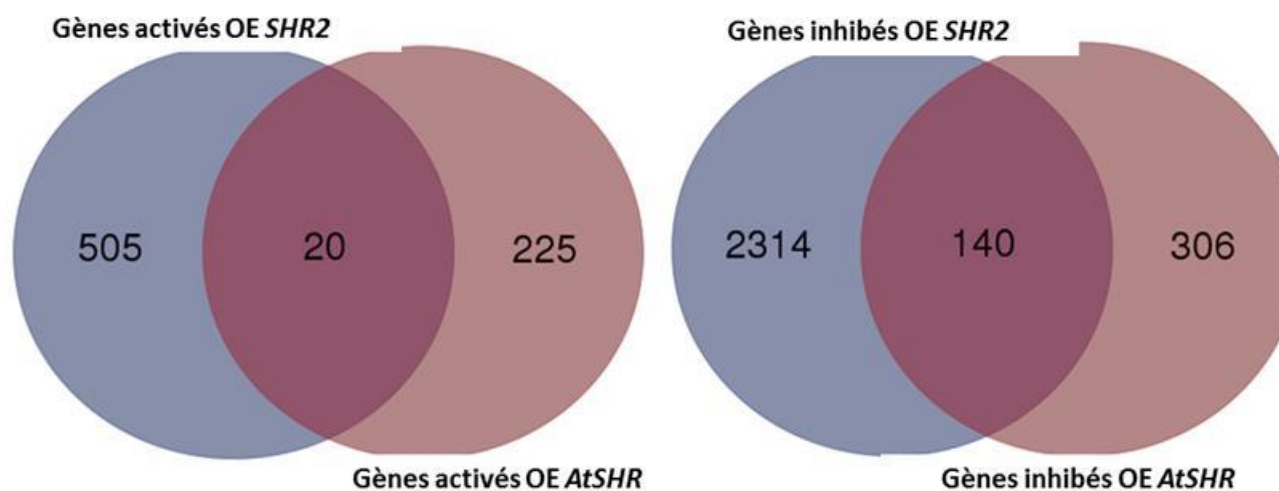
Nous avons utilisé la technique de qRT-PCR avec des primers localisés dans le 3'UTR (**Figure 20**). Le niveau d'expression des gènes endogènes ne semble pas être affecté par la surexpression. En effet, lorsqu'on compare le niveau d'expression du gène *SHR1* endogène (*SHR1e*) dans les lignées surexprimeurs (OE *SHR1* et OE *SHR2*) avec celui des échantillons de référence (vecteur vide), on ne remarque aucune tendance particulière. Cela signifie qu'il n'y a pas d'auto-activation de l'expression de *SHR1e* causée par sa surexpression ni de régulation par *SHR2*. Le même constat a été réalisé pour l'étude de l'expression de *SHR2e*. De ce fait, aucune activation ni régulation croisée entre les gènes *SHR* n'a pu être mise en évidence.

#### I.3.2 Etude du réseau d'interaction des *SHR*

Une analyse transcriptomique par RNAseq a été réalisée sur des échantillons de classes A (grosses racines) et B (WT) des trois lignées OE *SHR*. Cette technique consiste à séquencer les transcriptomes de chaque échantillon et à comparer les données d'expression des gènes. Cette technique permet ainsi de mettre en évidence des différentiels

**Tableau 4 : Différentiels d'expression observés dans les lignées OE *SHR* pour différentes catégories de gènes.**

	Accessions	Noms des gènes	Différentiel chez OE <i>AtSHR</i>	Différentiel chez OE <i>SHR1</i>	Différentiel chez OE <i>SHR2</i>
<b>Gènes contrôles</b>	Os07g27870	thioesterase family protein, putative, expressed	1,0	1,1	1,0
	Os12g38970	VIP4, putative, expressed	1,2	1,3	1,1
	Os03g01160	protein kinase family protein, putative, expressed	1,1	1,2	1,1
	Os06g11070	expressed protein EXP'	1,2	1,5	1,2
<b>Gènes SHR</b>	Os07g39820	OsSHR1	1,1	0,8	0,4
	Os03g31880	OsSHR2	0,7	0,8	50,0
	At4g37650	AtSHR	100	0,0	0,0
<b>Cibles SCR</b>	Os11g03110	SCARECROW 1, GRAS family transcription factor domain containing protein, expressed	1,3	1,1	2,8
	Os12g02870	SCARECROW 2, GRAS family transcription factor domain containing protein, expressed	1,2	1,5	3,5



**Figure 21 : Gènes régulés par la surexpression des gènes *SHR2* et *AtSHR***

2335 gènes ont été identifiés comme régulés chez OE *SHR2*, et 627 chez OE *AtSHR*.

(a) Diagramme de Venn correspondant aux gènes activés chez les deux lignées.

(b) Diagramme de Venn correspondant aux gènes inhibés chez les deux lignées.



d'expression de gènes, reflétant des voies de régulation par le biais d'activation ou d'inhibition de gènes cibles. Nous avons conduits une première série d'analyse préliminaire en séquençant une série de répétition biologique. Une deuxième série sera séquencée en 2016 afin de conduire une analyse différentielle *sensus stricto*. L'expérience menée ici a permis de donner un premier aperçu des voies moléculaires des gènes *SHR*, et des potentiels gènes cibles régulés.

A partir de ces données préliminaires, nous avons d'abord validé le jeu de données en vérifiant la stabilité de l'expression de gènes contrôles dans les échantillons de classe A et B (**Tableau 4**). Puis nous avons sélectionné les gènes régulés positivement et négativement pour chacune des lignées, en considérant un gène comme dérégulé lorsque le différentiel d'expression entre les deux phénotypes était supérieur à 3 ou inférieur à 0,3. Nous avons ainsi identifié 2335 gènes dérégulés chez OE *SHR2*, et 627 chez OE *AtSHR* (**Annexe 7**).

- **Confirmation de la surexpression des gènes *SHR2* et *AtSHR* dans les lignées OE *SHR2* et OE *AtSHR***

Les données transcriptomiques ont permis de confirmer la surexpression du gène *AtSHR* entre la classe A et la classe B de la lignée OE *AtSHR* (expression multipliée par un facteur 100), ainsi que dans la lignée OE *SHR2*, où le gène présentant des grosses racines est surexprimé 50 fois comparé à l'échantillon de phénotype WT. Nous n'avons cependant relevé aucune surexpression de *SHR1* dans la lignée OE *SHR1*. Cette absence de surexpression concorde avec les données de RT-PCR et suggère ainsi l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle de *SHR1*. Ce résultat appuie également l'hypothèse émise précédemment, qui soutient que la présence de *SHR1* au-delà d'un seuil serait toxique pour la plante (cf. I.1.1). Ces résultats nous permettent de conclure que, bien que les phénotypes « grosses racines et couches surnuméraires de cortex » soient retrouvés chez les trois lignées OE *SHR1*, *SHR2*, *AtSHR*, il est probable que les mécanismes diffèrent entre les lignées surexpresseurs *SHR1* et *SHR2/AtSHR*.

- **Existence de cibles communes aux gènes *SHR2* et *AtSHR***

En comparant les listes de gènes dérégulés entre les lignées OE *SHR2* et *AtSHR*, nous avons pu identifier des gènes régulés en commun, dont 20 gènes activés et 140 inhibés (**Figure 21**). Les gènes les plus fortement activés appartiennent à une famille multigénique cytochromes P450, qui sont des protéines impliquées dans de très nombreuses réactions métaboliques et hormonales ; ainsi que plusieurs enzymes et récepteurs kinases. L'utilisation du logiciel Mapman (<http://mapman.gabipd.org>), a permis de mettre en évidence que les gènes dérégulés en commun chez ces deux lignées semblaient appartenir au métabolisme secondaire, incluant la voie des terpènes (molécules impliquées dans le développement de la plante et dans la synthèse des brassinostéroïdes), des flavonoïdes ainsi que les phénylpropanoïdes et les phénols (molécules impliquées dans la protection de la plante aux UV, et la lignification des parois) (**Figure 22**). Nous avons également regardé les modifications d'expression des facteurs de transcription dans les deux lignées, et remarqué

OE *SHR2*

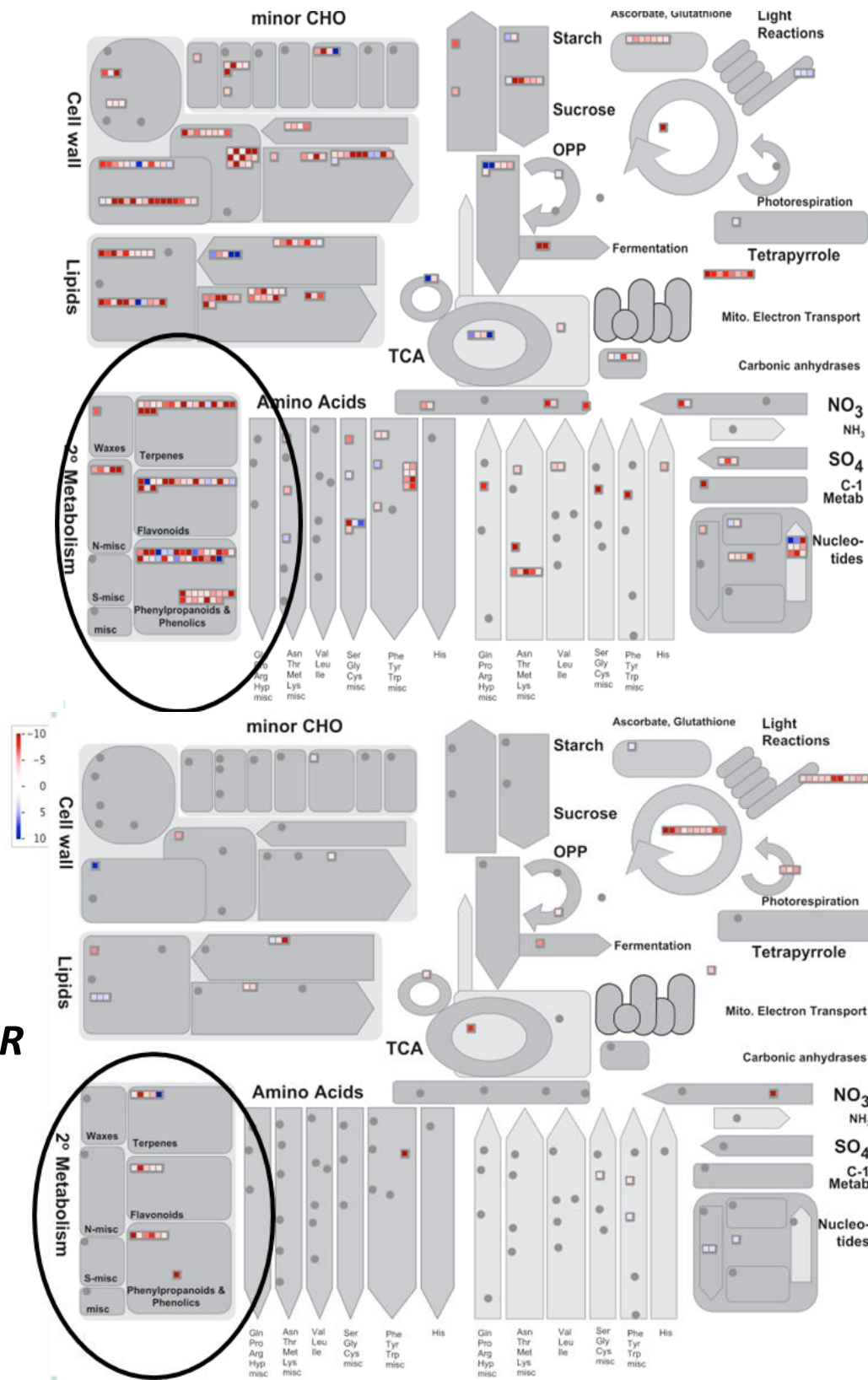


Figure 22 : Représentation graphique des voies métaboliques impactées par la surexpression des gènes *SHR2* et *AtSHR*.

Représentation faite à l'aide du logiciel MapMan (<http://mapman.gabipd.org>), sur les 2335 gènes régulés d'OE *SHR2*, et les 627 d'E *AtSHR*. Plus les gènes sont activés plus ils figurent en rouge, et leur inhibition figure en bleu. La surexpression de ces gènes impacte la voie des métabolites secondaires (entourée en noire), tandis que *SHR2* régulent des gènes dans presque toutes les voies métaboliques.

que peu de voies étaient touchées chez OE *AtSHR*, contrairement à OE *SHR2*, pour laquelle de nombreuses familles sont dérégulées (**Annexe 8**). On retrouve en effet les familles AP2 (*APETALA2*), EREBP (*ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEINS*), WRKY et MYB (*MYEOBLASTOSIS*), qui sont des facteurs de transcription impliqués dans différents processus de développement comme la floraison (Riechmann and Meyerowitz 1998), la tolérance aux stress biotiques et abiotiques (Pandey and Somssich 2009), et la formation du méristème (Jin and Martin 1999).

- **Faible activation des gènes *SCR* par la surexpression de *SHR2***

Une étude réalisée chez *A.thaliana* a mis en évidence une interaction entre les gènes *SHR* et *SCR*. *SHR* a la capacité d'induire l'expression de *SCR* en se fixant sur son promoteur (Helariutta, Fukaki et al. 2000; Nakajima, Sena et al. 2001; Sena, Jung et al. 2004; Cui, Levesque et al. 2007). Nous avons donc regardé si cette propriété était conservée chez le riz, en vérifiant que le niveau d'expression des gènes *SCR1* et *SCR2* étaient bien augmenté chez les surexprimeurs. En effet, les gènes *SCR1&2* semblent être activés dans la lignée OE *SHR2*, selon un ratio de 2,8 et 3,5 respectivement (**Tableau 4, Annexe 7**), conformément au modèle d'activation transcriptionnel de *SCR* par *SHR* chez *A.thaliana*. Cependant, aucune activation de ces gènes n'est observée pour les lignées OE *AtSHR* et OE *SHR1*. Ce résultat peut être expliqué par le fait que *SHR1* ne soit pas surexprimé dans les plantes OE *SHR1* (cf. paragraphe suivant), en revanche pour *AtSHR*, cela suggère que la reconnaissance entre *AtSHR* et les *SCR1* et *SCR2* soit perturbée.

- **Aucune surexpression observée pour *SHR1***

Aucune surexpression du gène *SHR1* n'a été démontrée dans la lignée *pUBI:SHR1*. L'expression des gènes *SCR1&2* ne semble pas être affectée non plus. Ces résultats inattendus suggèrent encore une fois que les mécanismes conduisant à la production de couches de cortex surnuméraires chez les surexprimeurs *OsSHR1* et *OsSHR2* sont distincts. Un total de 2324 gènes semble dérégulés dans la lignée OE *SHR1*, dont 20% activés et 80% inhibés. Nous avons observé que les deux lignées OE *SHR1* et OE *SHR2* présentaient plus de 30 % de leurs gènes dérégulés en commun (**Figure 23**). De plus, les voies métaboliques représentées par les gènes différentiellement exprimés chez OE *SHR1* sont similaires à celles observées chez OE *SHR2* (**Figure 24**), tout comme les nombreuses familles de facteurs de transcriptions régulées dans la lignée OE *SHR1* le sont aussi chez OE *SHR2* (**Annexe 9**).

Nous n'avons à ce jour, aucune explication satisfaisante pour réconcilier l'ensemble des résultats obtenus pour les surexprimeurs *SHR1* et *SHR2*. L'analyse des lignées KO (cf. Chapitre 2. III) permettra peut-être de mettre en évidence une différence de fonction entre ces gènes. L'utilisation de lignées surexprimeur inductibles semble aussi être un outil approprié, qui pourrait être utilisé dans le but de comparer les données transcriptomiques des lignées surexprimeurs *SHR1*, *SHR2* et *AtSHR* avec celles d'une lignée sauvage et de lignées KO, tout en s'affranchissant des problèmes de régénération. Nous pourrions ainsi

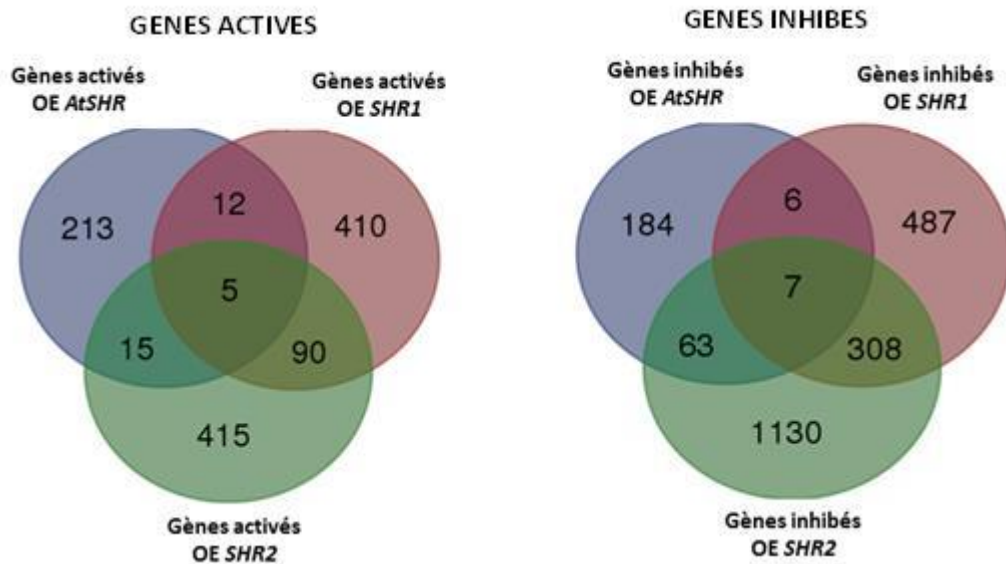


Figure 23 : Diagrammes de Venn illustrant les gènes en commun régulés chez les lignées OE *SHR1*, OE *SHR2* et OE *AtSHR*. 2335 gènes ont été identifiés comme régulés chez OE *SHR2*, et 627 chez OE *AtSHR* et 2324 chez OE *SHR1*.

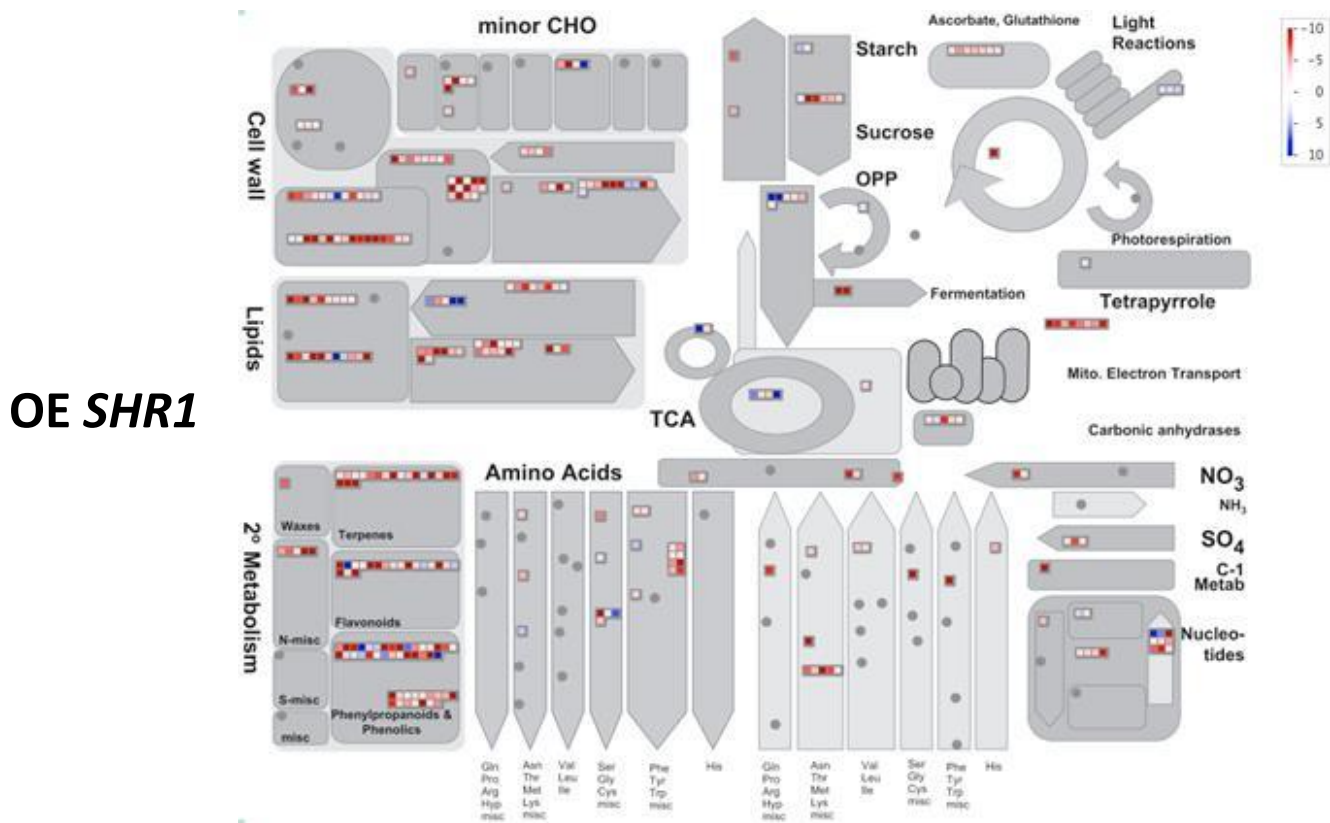


Figure 24 : Représentation graphiques des voies métaboliques impactées par la présence du transgène *pUBI:SHR1*.

Représentation faite à l'aide du logiciel MapMan (<http://mapman.gabipd.org>), sur les 2335 gènes régulés d'OE *SHR2*, et les 627 d'E *AtSHR*. Plus les gènes sont activés plus ils figurent en rouge, et leur inhibition figure en bleu. La surexpression de ces gènes impacte la voie des métabolites secondaires (entourée en noire), tandis que *SHR2* régulent des gènes dans presque toutes les voies métaboliques.

comparer les répertoires de gènes régulés par ces trois facteurs de transcription, et conclure quant aux mécanismes moléculaires qui leur sont propres.



## Conclusion : un rôle commun des gènes *SHR* dans la mise en place du cortex racinaire, mais via des mécanismes distincts

L'expression ubiquitaire des trois gènes *SHR* dans le riz engendre le même phénotype, à savoir la formation de couches surnuméraires de cortex. L'expression ectopique des gènes *SHR* induirait d'une part les divisions méristématiques des initiales conduisant à la formation de nombreuses couches supplémentaires d'outer-cortex, et d'autre part des divisions tardives intrinsèques dans ce tissu. Les racines formées comprennent alors jusqu'à 6 fois plus de couches de cortex que les racines contrôles, entraînant des problèmes de survie de la plante (seuls les phénotypes faibles ont survécu au transfert en serre). Un phénotype foliaire est également observé pour ces trois lignées, avec une diminution du nombre de faisceaux vasculaires et de cellules bulliformes. Ces phénotypes foliaires et racinaires sont communs aux trois lignées OE *SHR* et amènent donc à penser qu'ils auraient une fonction similaire. Ces gènes semblent donc être impliqués dans la mise en place du tissu cortical, et semblent aussi participer à l'architecture foliaire. Ces résultats confirment l'hypothèse avancée par Wu et al. selon laquelle il existerait une conservation de fonction entre les gènes *SHR* (Wu, Lee et al. 2014).

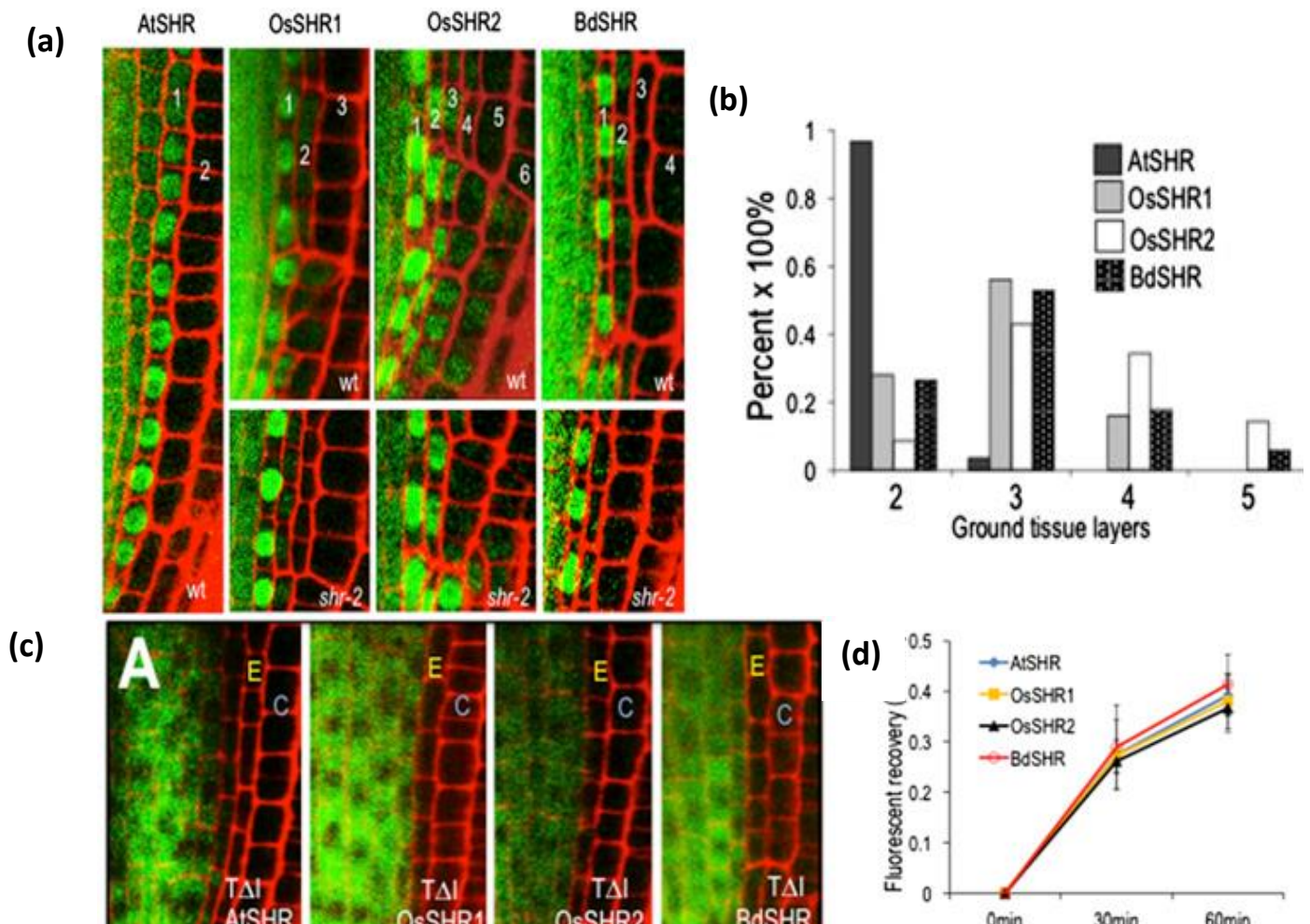
Les trois lignées OE *SHR* présentent des phénotypes racinaires graduels, avec de grandes similitudes dans la répartition en classes pour les deux lignées OE *SHR2* et *AtSHR*. Une corrélation entre le niveau d'expression des gènes et les phénotypes observés a été mise en évidence pour ces deux lignées, suggérant le mécanisme suivant : plus la concentration en transcrits serait élevée dans la racine, plus les protéines y seraient accumulées et induiraient ainsi des divisions ectopiques conduisant à la formation de couches surnuméraires de cortex. *SHR1* semble, quant à lui, ne pas avoir recours au même mécanisme. Des défauts de régénération ont été observés, avec plus de la moitié des plantes qui ne survivent pas à la transformation génétique, supposant un effet toxique du gène à forte dose. De plus, les plantes rescapées ne montrent aucun signe de surexpression que ce soit au niveau transcriptionnel ou traductionnel. *SHR1* et *SHR2* auraient donc tous les deux un rôle dans la mise en place du cortex, mais fonctionneraient indépendamment (pas de régulation croisée) et selon des mécanismes différents.

L'étude de nos collaborateurs portant sur les gènes *SHR* de monocotylédones chez *A.thaliana* a mis en évidence une particularité de *SHR2* : sa protéine serait plus mobile que ses paralogues (Wu, Lee et al. 2014). Cette caractéristique pourrait expliquer les problèmes de régénération encourus chez les plantes OE *SHR1* : la présence ectopique de cette protéine perturberait plus le développement de la plante que la présence ectopique de *SHR2*, qui aurait déjà la capacité de se déplacer dans tous les tissus internes dans les plantes sauvage. Nous pouvons donc supposer que les plantes présentant une forte surexpression de *SHR1* n'aient pas survécu, et que les plantes que nous avons pu analyser dans le cadre de cette étude n'expriment pas ou peu le transgène. L'expression ectopique de *SHR1* serait donc létale pour la plante, tandis qu'une expression tissu-spécifique ou méristématique pourrait suffire à induire des divisions des initiales et conduire à la formation de couches





surnuméraires de cortex. Cependant, nous ne disposons pas des outils nécessaires pour tester cette hypothèse à l'heure actuelle. Il faudrait en effet pouvoir localiser la protéine et le transcrit de *SHR1* dans la lignée OE *SHR1*, et tester les mobilités des protéines SHR dans le riz.



**Figure 25 : Les protéines SHR bougent au-delà de l'endoderme et induisent des couches de cortex chez *A.thaliana*** (Wu, Lee et al. 2014)

(a) Images des gènes SHR fusionnés à la YFP, prises au microscope confocal. Les gènes sont sous le contrôle du promoteur d'*AtSHR*, et exprimés dans le Wild-type et le mutant *shr2*. Les numéros correspondent aux couches adjacentes à la stèle.

(b) Quantification du nombre de couches de tissus internes formées, causé par l'expression des homologues SHR (n=3, 35 racines étudiées pour chacun des homologues)

(c) Images des protéines SHR avec la thréonine conservée mutée en alanine fusionnées à la YFP et prises au microscope confocal.

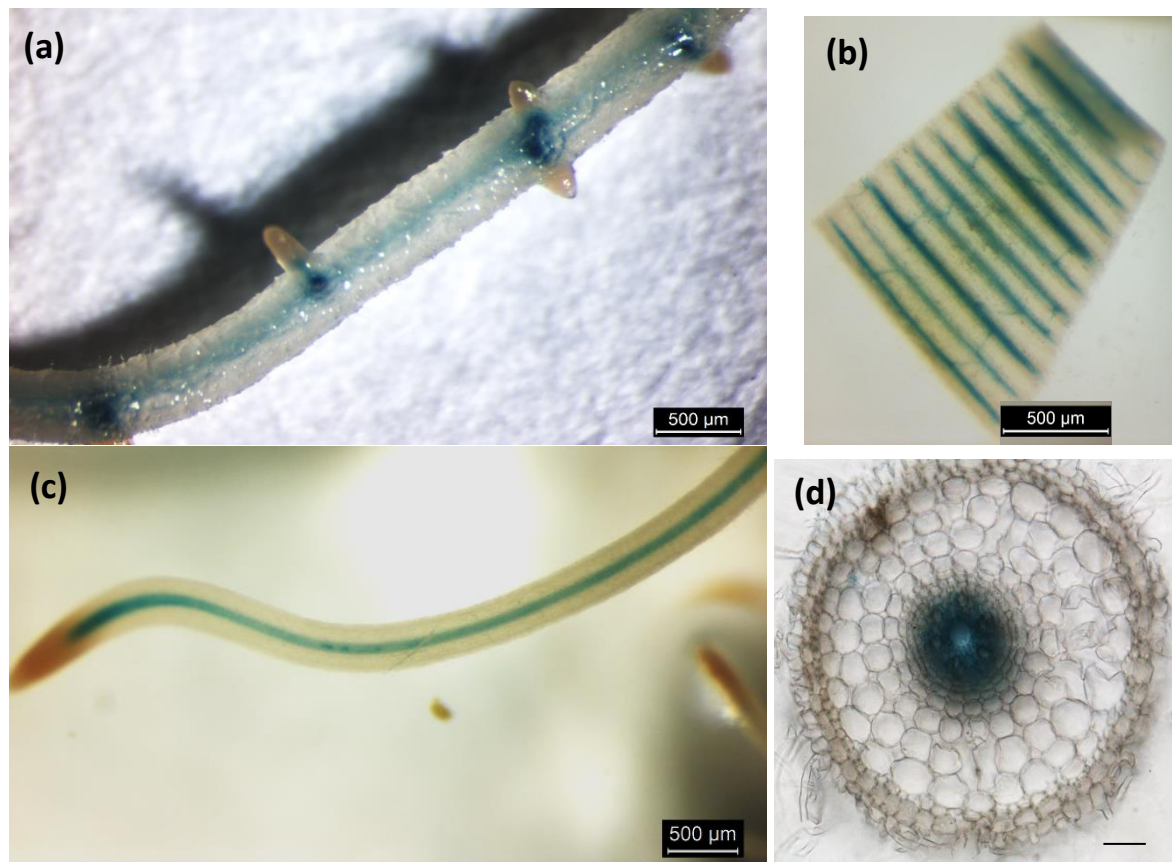
(d) Cinétique du recouvrement de la fluorescence après un photobleaching (FRAP) pour les protéines SHR

## II. Analyse de la mobilité des protéines SHR1, SHR2 et AtSHR dans le riz

La récente co-publication faite avec nos collaborateurs de l'Université de Pennsylvanie a abouti à l'hypothèse d'une probable corrélation entre la mobilité des protéines SHR et le nombre de couches de cortex présentes dans les organismes où elles sont exprimées (Wu, Lee et al. 2014). Cette étude a mis en évidence la similarité de fonctions entre les protéines SHR de riz et de *Brachypodium distachyon* grâce à la complémentation du mutant *shr-2* d'*Arabidopsis thaliana*, chez lequel ces protéines ont la capacité de restaurer la formation et l'identité de la couche d'endoderme. Cette étude a également mis en exergue la capacité de ces protéines à migrer au-delà de l'endoderme chez *A.thaliana*. Cette mobilité s'accompagne de la formation de couches surnuméraires de cortex dont le nombre dépendrait de la capacité de migration de la protéine. En effet, cette étude a démontré que la protéine SHR2 était plus mobile que SHR1 et BdSHR et qu'elle induisait plus de couches supplémentaires de cortex que ses co-orthologues (**Figures 25 a & b**). Le mécanisme à l'origine de cette mobilité serait conservé entre les espèces étudiées. La thréonine du domaine VHID, dont la mutation en alanine engendre la perte de mobilité d'AtSHR (Gallagher, Paquette et al. 2004), est conservée chez ces espèces et est également nécessaire à la mobilité de ces protéines (**Figure 25 c**). Pour conclure, ce travail a mis en évidence l'existence d'un mécanisme conservé de la mobilité de ces protéines, avec la régulation de leur transport par une thréonine conservée dans le domaine GRAS, des cinétiques de mouvement similaires (**Figure 25 d**), et l'utilisation des mêmes voies de transport via les plasmodesmes. La présence de plusieurs couches de cortex chez le riz (Rebouillat, Dievart et al. 2009) et *B.distachyon* (Watt, Schneebeli et al. 2009; Pacheco-Villalobos and Hardtke 2012) pourrait être expliquée grâce à ces résultats selon l'hypothèse suivante : les protéines SHR de monocotylédones ne seraient pas séquestrées dans l'endoderme dans leurs organismes respectifs, elles pourraient donc migrer dans les couches adjacentes et induire ainsi la formation de plusieurs couches de cortex. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le nombre variable de ces couches. Il est possible qu'il soit dû à la formation d'un gradient de protéines SHR dans ce tissu, ou bien que la mobilité des protéines SHR soit contrôlée directement, ou encore que le turn-over de leur dégradation soit finement contrôlé.

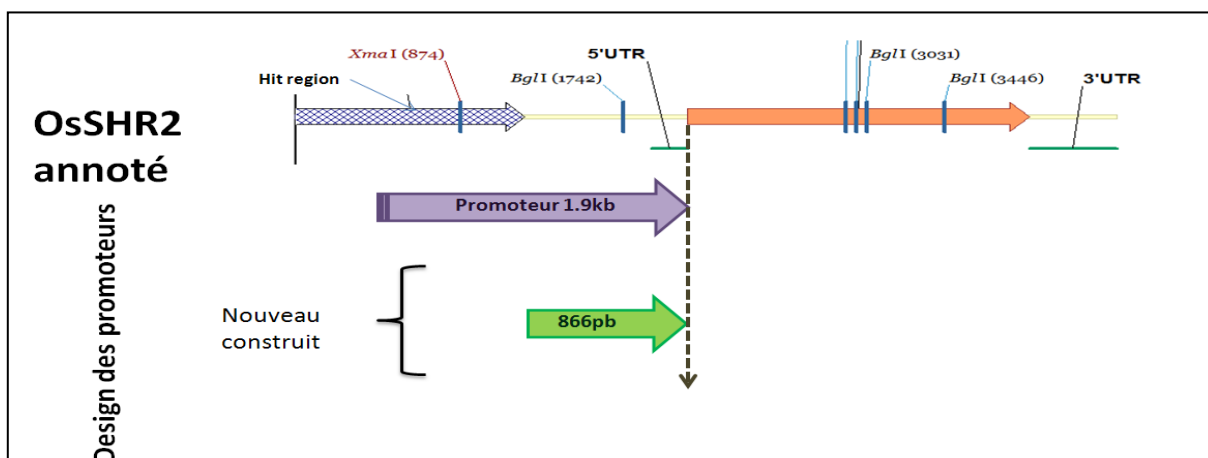
L'analyse de la surexpression des trois gènes *SHR* (*OsSHR1*, *OsSHR2* et *AtSHR*) a permis de mettre en évidence l'induction de la formation de couches surnuméraires de cortex. Les résultats des immunolocalisations sur des racines des lignées OE *SHR2* et OE *AtSHR* ont confirmé l'accumulation des protéines dans tous les tissus racinaires. Ces résultats vont dans le sens de l'hypothèse émise précédemment, qui consiste à corréler la présence des protéines aux nombre de couche de cortex présentes.

Nous avons décidé d'étudier la mobilité des protéines SHR1, SHR2 et AtSHR dans le riz, afin de pouvoir comparer avec les résultats obtenus chez *A.thaliana* et de pouvoir confirmer cette hypothèse. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps étudié la



**Figure 26 : Profil d'expression pour le gène *OsSHR1*, dont le promoteur est fusionné à la protéine GUS.**

- (a) *OsSHR1* est exprimé dans la racine, au niveau des primordia de racines latérales
- (b) *OsSHR1* est exprimé les nervures des feuilles
- (c) *OsSHR1* est exprimé tout au long de la racine jusqu'à la coiffe
- (d) *OsSHR1* est exprimé dans la stèle des racines. Barre=50µm



**Figure 27 : Annotation de la séquence promotrice d'*OsSHR2***

localisation des transcrits, que nous avons ensuite comparé à la localisation des protéines grâce à l'utilisation de fusions traductionnelles.

## II.1 Etude de la localisation des transcrits SHR

Au cours de sa thèse, Germain Pauluzzi avait réalisé des fusions transcriptionnelles pour les gènes *SHR1* et *SHR2*. Le construit *pSHR1:GUS* avait permis d'étudier le profil d'expression de ce gène dans la plante. Les lignées obtenues révèlent une expression du transcrit spécifique des faisceaux vasculaires. On le retrouve dans la stèle au niveau des racines et au niveau des nervures des feuilles (**Figure 26**). En revanche, le construit *pSHR2:GUS* n'avait donné aucun signal. Nous avons entrepris de réannoter la séquence promotrice utilisée. Au sein des 1,9 kb sélectionnés, nous avons relevé la présence de motifs hautement répétés dans la partie 5' de la séquence promotrice. Ces motifs auraient pu induire un silencing de la construction par méthylation massive. C'est pourquoi nous avons donc décidé d'utiliser une nouvelle séquence raccourcie à 900 pb (**Figure 27**). Aucun signal GUS n'a été observé pour les plantes de la génération T1, quel que soit le stade (plantule ou plante en serre). Si l'on se base sur des données déjà existantes, le profil de *SHR1* obtenu au laboratoire concorde avec ceux publiés dans la littérature (Cui, Levesque et al. 2007) et ceux disponibles sur le site japonais RiceXpro (<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>) (**Figure 28 a**). Quant au gène *SHR2*, aucune donnée publiée n'est disponible à ce jour, mais la base de données japonaise stipule que le profil d'expression racinaire du gène est similaire à celui de *SHR1* : *SHR2* serait exprimé dans la stèle mais serait aussi retrouvé faiblement dans les autres tissus internes (cortex, exoderme, sclérenchyme...) (**Figure 28 b**).

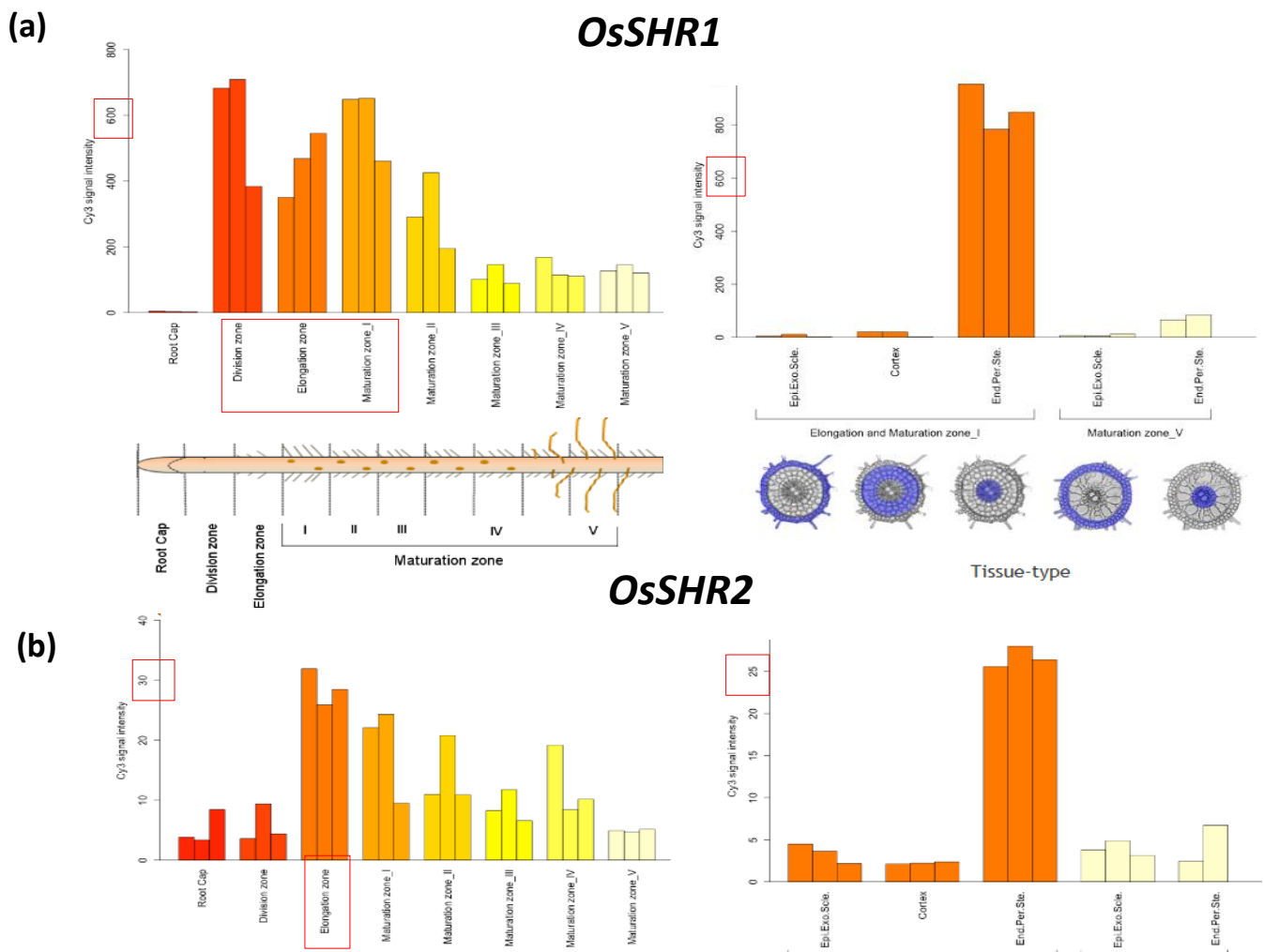
La technique d'hybridation *in situ* aurait pu être une alternative intéressante pour localiser les transcrits *SHR1* et *SHR2*, cependant nous ne disposons pas des contrôles nécessaires. En effet, les seules sondes spécifiques des gènes sont localisées dans les 3'UTR, qui ne sont pas inclus dans les surexprimeurs. Nous ne pouvons donc pas les utiliser comme contrôles positifs, et ne disposant pas encore de lignées Knock-Out à cette période nous n'avons pas de contrôle négatif non plus.

## II.2 Analyses des fusions traductionnelles chez le riz

### II.2.1 Réalisations des fusions traductionnelles

Nous avons donc décidé de réaliser les trois fusions traductionnelles sous le contrôle du promoteur d'*OsSHR1*. Bien que les gènes *OsSHR2* et *AtSHR* ne soient pas sous le contrôle de leurs propres promoteurs, ces constructions nous permettent d'étudier leur mobilité chez le riz. Nous savons qu'*OsSHR1* est transcrit dans la stèle, et que donc toute protéine en fusion traductionnelle avec la GFP retrouvée en dehors de la stèle confirmera que la

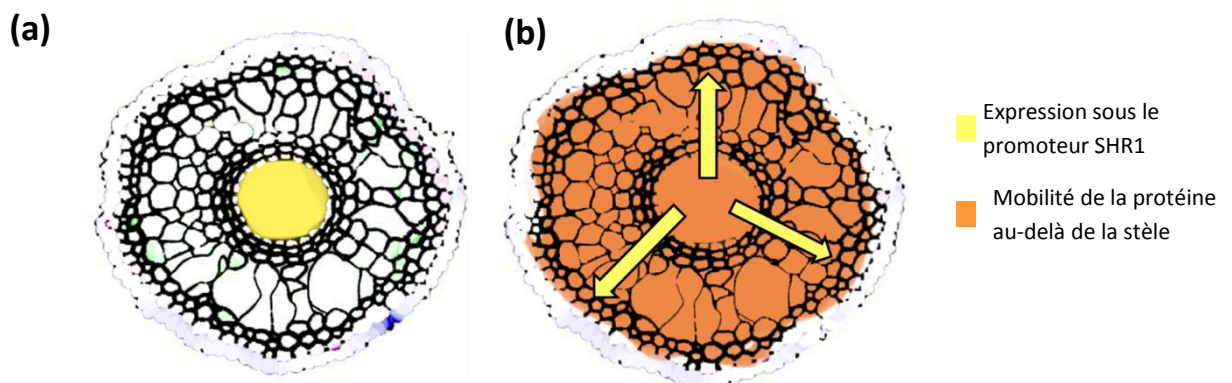




**Figure 28 : Profils d'expression d'*OsSHR1*&*OsSHR2* dans la racine d'après les analyses transcriptomiques disponibles sur le site RiceXPro <http://ricexpro.dna.affrc.go.jp>**

(a) Profil d'expression d'*OsSHR1* qui est principalement exprimé dans les zones de divisions et d'élongation dans la racine, et ce, au niveau de la stèle.

(b) Profil d'expression d'*OsSHR2* qui est 20 fois moins exprimé que *OsSHR1* et dont l'expression est aussi localisée les zones de divisions et d'élongation de la racine, au niveau de la stèle.



**Figure 29 : Mobilité attendue de la protéine**

(a) Les protéines SHR sont exprimées sous le contrôle du promoteur *SHR1* qui est retreint à la stèle.

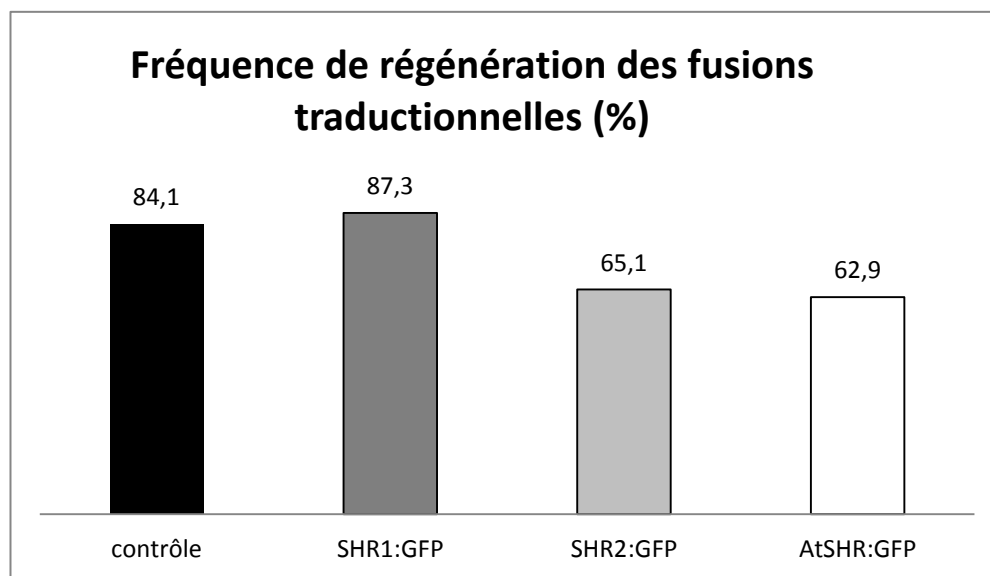
(b) Si les protéines *SHR* sont mobiles, elles sont capable de bouger au-delà de la stèle (flèches) et peuvent migrer dans les tissus internes.

protéine est mobile (**Figure 29**). Nous avons ainsi réalisé une transformation en janvier 2015 de cals de la variété *Nipponbare* avec les vecteurs pCambia 5300 contenant les fusions GFP et le vecteur originel contenant l'insert *pOsSHR1::GUS* comme contrôle. Le même linker situé entre la séquence de la protéine d'intérêt et la protéine rapporteur que celui décrit dans (Cai, Fedeles et al. 2014) a été utilisé. Contrairement à ce qui a été fait pour l'analyse des homologues chez *A.thaliana*, nous avons exprimé ces vecteurs dans la variété sauvage de riz et non dans des mutants perte de fonction, car ils n'étaient pas encore disponibles à cette époque.

## II.2.2 Phénotypage des plantes en serre

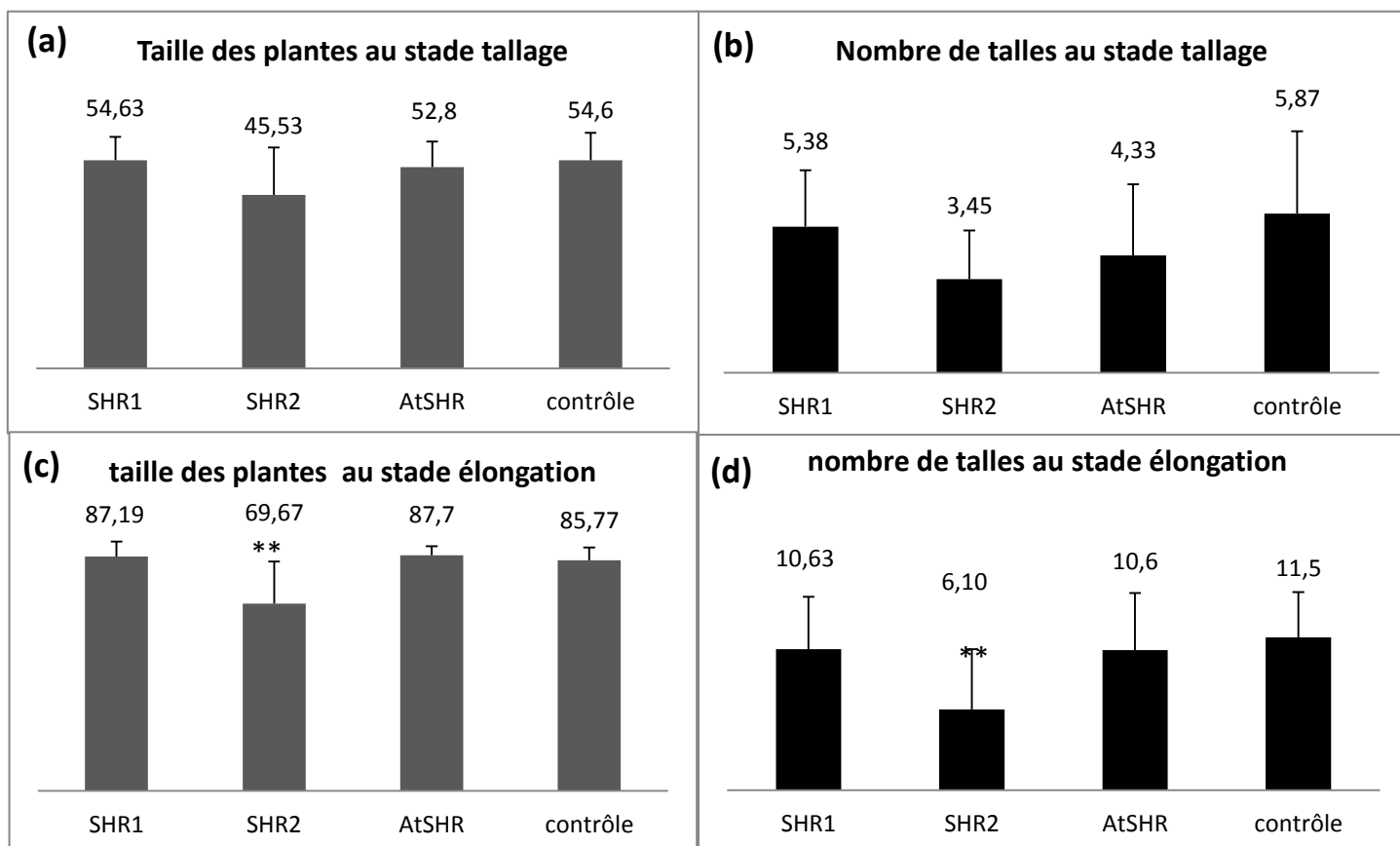
Afin de savoir si les fusions *SHR*:GFP avait un impact sur le développement des cals, nous avons suivi leur régénération au cours du temps. Aucun retard ni blocage de régénération n'a été observé comparativement aux lignées surexprimeurs. Le taux de régénération des trois lignées s'élève à plus de 60 % et est assez homogène (**Figure 30**). La modification de l'expression des *SHR* dans la plante, engendrée par l'introduction des fusions traductionnelles, ne semble pas perturber la régénération des cals.

Au cours des cinq semaines de régénération, chaque cal a été observé à quatre reprises sous la loupe binoculaire à fluorescence avec un filtre GFP afin d'identifier les fusions fonctionnelles. Aucun signal GFP n'a été observé pendant la régénération. Suite à cette étape, environ 25 plantules par lignées ont été passées en tubes puis phénotypées. Le phénotypage, basé sur les mêmes critères que les autres plantes transgéniques, c'est-à-dire sur la morphologie racinaire (épaisseur, tortuosité, longueur des racines) et sur le développement de l'appareil aérien (nombre de talles, enroulement des feuilles...) a été réalisé sur les plantules passées en tube depuis une semaine. A ce stade, aucun phénotype particulier n'a été relevé. En raison des difficultés à analyser les plantes à travers les tubes en verre, aucun suivi de la fluorescence n'a été effectué durant cette étape. Avant le transfert en serre des plantes transgéniques, une sélection des plantes monocopies a été effectuée par qPCR. Ainsi, 16 plantes ont été retenues pour la fusion *SHR1*:GFP, 20 pour *SHR2*:GFP, et 15 pour *AtSHR*:GFP et le contrôle négatif. Ces 66 plantes ont été phénotypées à deux reprises : la première fois au stade tallage (trois semaines après être passées en serre) puis au stade d'élongation (50 jours après leur transfert). Au stade tallage, aucun impact significatif sur la taille ni sur le nombre de talles n'a été observé chez les plantes (**Figures 31 a & b**). Cependant nous avons relevé des phénotypes commun à ceux observés chez les surexprimeurs tels que des feuilles enroulées (**Figures 32 a & b**). Curieusement ce phénotype a été observé chez 70% des plantes de la lignée *SHR2*:GFP et 20% des plantes *SHR1*:GFP (**Figure 31 c**) et aucune plante *AtSHR*:GFP. Après un mois et demi en serre (50 jours), le nombre de talles et la taille des plantes *SHR2*:GFP sont significativement inférieurs à ceux de la lignée contrôle (**Figures 32 c & d**), et l'enroulement des feuilles s'est accentué



**Figure 30 : Taux de régénération des cals transformés GFP**

Taux de régénération pour la transformation des fusions traductionnelles d'*OsSHR1* (n=118), d'*OsSHR2* (n=109), d'*AtSHR* (n=132) et du contrôle (n=113).



**Figure 31 : Résultats de phénotypage du nombre de talles des plantes et de leur taille, pour chacune des fusions traductionnelles**

*pOsSHR1:OsSHR1:GFP* (n=16), *pOsSHR1:OsSHR2:GFP* (n=20), *pOsSHR1:AtSHR1:GFP* (n=15) et le contrôle *pOsSHR1 :GUS* (n=15). (student t-test , p-value <0.05)

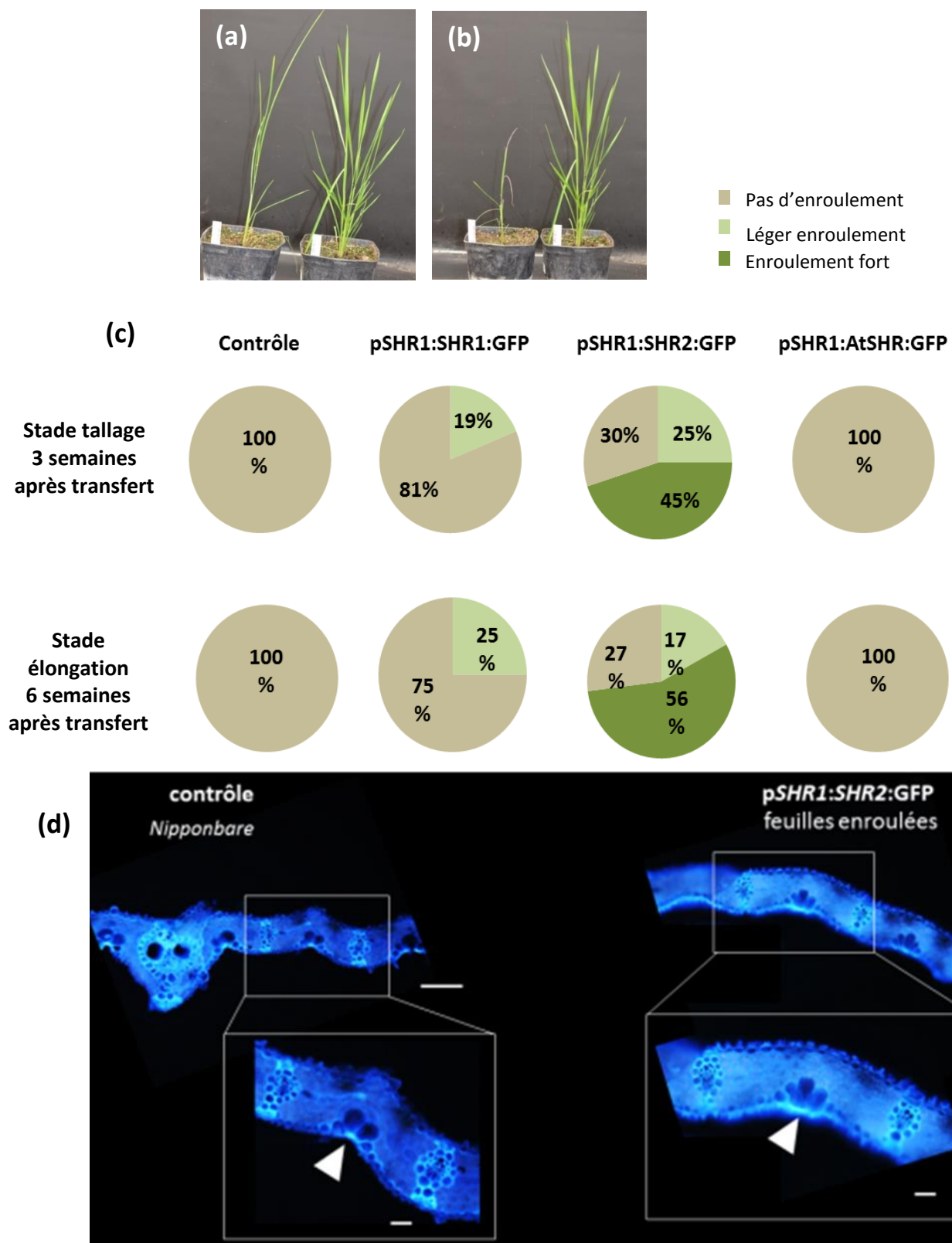


en passant de 19 à 25% chez la lignée *SHR1*:GFP et de 70 à 73% chez *SHR2*:GFP (**Figure 31 c**). Des coupes radiales des feuilles des trois lignées *SHR*:GFP ont été réalisées et révèlent que les plantes présentant des feuilles enroulées montrent les mêmes modifications anatomiques de l'architecture foliaire que celles observées chez les surexprimeurs *pUBI:SHR*, à savoir une diminution du nombre de faisceaux secondaires et une diminution du volume des cellules bulliformes (**Figure 32 d**).

L'expression ectopique des protéines *SHR* sous le contrôle du promoteur *SHR1* semble perturber le développement des plantes en provoquant des phénotypes aériens semblables à ceux observés chez les surexprimeurs mais à des degrés plus faibles. Cependant seul un enroulement des feuilles a été remarqué, aucune augmentation du diamètre racinaire des plantes en tube ni de blocage de régénération, ni de problème de fertilité n'ont été observés.

### II.2.3 Observation du signal GFP

Afin d'effectuer des observations préliminaires des plantes présentant une fusion GFP fonctionnelle, nous avons prélevé un talle sur chacune de ces plantes, placé celui-ci dans de l'eau osmosée pendant trois jours et observé les nouvelles racines induites à la loupe binoculaire à fluorescence. Quelques signaux faibles ont été observés (**Annexe 10**), mais il était difficile de discriminer ce signal de l'autofluorescence des tissus. Pour confirmer la présence de ce potentiel signal GFP nous avons effectué des analyses sur l'appareil aérien. Des prélèvements de feuilles ont été pratiqués sur les plantes en serre. Après une décoloration, elles ont été coupées de manière transversale puis observées sous microscope optique à l'aide d'un filtre GFP. Aucun signal spécifique n'a été observé, même chez les feuilles présentant un enroulement fort (**Annexe 10**). Le signal perçu lors de l'analyse des racines était probablement de l'autofluorescence. Nous poursuivrons nos analyses sur la génération suivante, pour laquelle des semis de 10 graines par plante seront effectués, et des racines de plantules âgées de 6 jours seront coupées puis observées au microscope à épifluorescence ou au multiphoton.



**Figure 32 : Phénotypage des 3 lignées de fusions traductionnelles**

(a) Exemple d'une plante au phénotype feuilles enroulées (à gauche) comparé au contrôle (à droite) (b) Exemple d'une plante au phénotype feuilles fortement enroulées (à gauche) comparé au contrôle (à droite). (c) Graphiques montrant la répartition en 3 classes de phénotypes pour les trois lignées d'intérêt et le contrôle. (d) Coupes transversales de feuilles de plante contrôle à gauche et de plante à feuilles surenroulées (à droite), décolorées à l'éthanol 70% et observer sous UV au microscope optique. Les feuilles présentent une baisse de volume des cellules bulliformes (triangle) et un éloignement entre les faisceaux secondaires (\*). Barres = 50µm

## Conclusion : la protéine SHR2 plus mobile que SHR1 ?

La récente co-publication faite avec nos collaborateurs de l'Université de Pennsylvanie a mis en évidence la mobilité des protéines SHR de riz chez *A.thaliana* selon les mêmes mécanismes connus pour AtSHR (même cinétique et même voie de transport) (Wu, Lee et al. 2014). Les protéines SHR1 et SHR2 migrent au-delà de l'endoderme et induisent la formation de couches surnuméraires de cortex, avec la particularité que SHR2 serait plus mobile que SHR1 et engendrerait ainsi la formation de plus de couches.

Nous avons tenté d'étudier la mobilité de ces protéines chez le riz, en comparant dans un premier temps leurs profils transcriptionnels et traductionnels. Le transcrit *SHR1* est localisé dans la stèle, mais nous n'avons, à ce stade, aucune information sur la localisation de la protéine. Quant à *SHR2*, nous ne disposons pas d'outils permettant de localiser son transcrit dans la racine. La base de données japonaise RiceXPro suggère néanmoins que celui-ci soit aussi localisé à un niveau élevé dans la stèle mais également dans les tissus internes à des concentrations beaucoup plus faibles. Les immunolocalisations avec l'anticorps spécifique de protéine SHR2 nous ont permis de localiser celle-ci dans les tissus internes à des concentrations semblables dans tous les tissus de la stèle jusqu'à l'exoderme. Elle présenterait une localisation nucléaire et cytosolique dans la stèle et seulement nucléaire dans les tissus internes. Le fait que la protéine soit présente à concentration semblable dans tous les tissus suggère qu'elle serait apte à se déplacer de la stèle et à s'accumuler dans tous les tissus.

Les fusions traductionnelles réalisées pour les trois gènes *SHR* n'ont pas donné de signal GFP pour les plantes en génération T0 que ce soit dans les feuilles ou dans les racines. Il nous faudra attendre la génération T1 et la fixation des lignées homozygotes pour espérer voir un signal. Lors de l'analyse des lignées GFP en T0, nous avons tout de même observé un phénotype différent pour la fusion traductionnelle de SHR2. Cette lignée présente un enroulement des feuilles présent chez 70% des plantes. Cela signifie que *SHR2*, même exprimé sous le contrôle d'un promoteur autre que le sien (*pSHR1*), est capable d'induire un phénotype foliaire.

Ces résultats vont dans le sens de l'hypothèse émise précédemment, qui dit que les mécanismes des protéines SHR1, SHR2 et AtSHR ne sont pas identiques, et que SHR2 pourrait être plus mobile que ses orthologues.

Tableau 5 : Inventaire des lignées TILLING disponibles

lignées	mutations	Position de la mutation	Acides Aminés	Impact sur la protéine
404 874	T1057C	353	S en P	<b>Serine</b> : polaire <b>Proline</b> : apolaire, ne peut pas adopter plusieurs conformations, intervient dans hélice $\alpha$
404 288	C1166T	389	S en F	<b>Sérine</b> : petite et polaire, neutre <b>Phénylalanine</b> : aromatique et hydrophobe
	C568A	189: région riche en glycine	G en G	mutation <b>silencieuse</b>
405 566	G1169A	390	G en E	<b>Glycine</b> : apolaire, petit <b>Acide glutamique</b> : petit, négatif, rôles semblables à ceux de G
	564A			mutation <b>silencieuse</b>
402385	G1168A	390	G en R	<b>Glycine</b> : apolaire, petit <b>Arginine</b> : polaire, positif, généralement à l'extérieur de la protéine
	C567A	291		mutation <b>silencieuse</b>
403336	G522A	175: région riche en glycine	G en D	<b>Glycine</b> : apolaire, petit <b>Acide Aspartique</b> : polaire, négatif, souvent en surfade des protéines, souvent impliqués dans les ponts salins

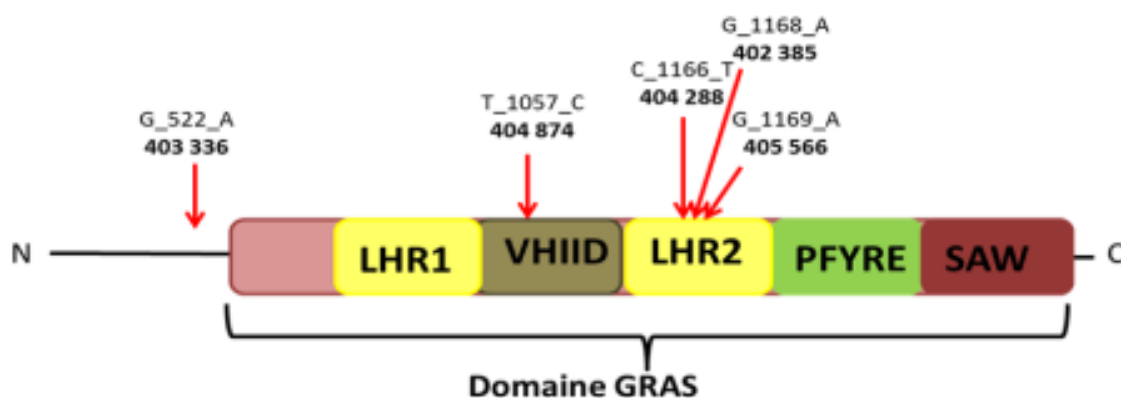


Figure 33 : Positions des mutations ponctuelles TILLING dans la protéine *OsSHR1*

### III. Création de mutants perte de fonction

#### Introduction

L'étude de la surexpression nous a donné des informations précises sur l'implication des gènes *OsSHR1&2* dans la formation du cortex. *OsSHR2* et *AtSHR* peuvent induire la formation de couches de cortex surnuméraires lorsqu'ils sont surexprimés. Cependant, l'expression ectopique n'apporte que des indications indirectes sur la fonction de *SHR1* et *SHR2*. Nous ne sommes toujours pas capables de distinguer la fonction des deux paralogues. Jusqu'à maintenant nous savons que *SHR1* engendre plus de problèmes de régénération que *SHR2*, et que l'expression sous contrôle du promoteur *pSHR1* de *SHR2* engendre un phénotype aérien beaucoup plus fort que celle de *SHR1*. Il semble de plus que *SHR1* ne soit pas surexprimé dans les plantes de la lignée OE *SHR1*, bien que les phénotypes observés soient similaires à ceux des « vrais » surexprimeurs *SHR2* et *AtSHR*. Cela suggère probablement que leurs rôles et leurs modes de fonctionnement ne sont pas identiques dans la plante. Pour mieux comprendre la fonction de ces facteurs de transcription, l'obtention de mutants pertes de fonction est essentielle. Ces mutants nous permettront de distinguer le rôle de ces deux gènes. De ce fait, plusieurs techniques en parallèle ont été menées au cours de ces trois années de thèse, telle que le criblage d'une population TILLING ou la réalisation de lignées transgéniques mutantes utilisant la technologie CRISPR et TALEN.

#### II. 1 Criblage d'une population TILLING

Une population de TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) (Till, Cooper et al. 2007) provenant de l'université de Californie (UC Davis) a été criblée pour les gènes *SHR1*. Cinq lignées comportant chacune une mutation ponctuelle dans la séquence codante de *SHR1* ont été obtenues puis multipliées au laboratoire (**Tableau 5**). Les mutations n'ont pas conduit à l'apparition de codon stop. Seules des mutations ponctuelles ont été identifiées, localisées principalement au niveau du domaine conservé de la protéine (domaine GRAS), et plus particulièrement au niveau du domaine Leucine Heptad repeat II (LHR2) (**Figure 33**). Ces mutations ponctuelles ont provoqué des changements d'acides aminés susceptibles de perturber la conformation et la fonction de la protéine *SHR1*. Nous avons donc regardé si les propriétés des acides aminés mutés étaient éloignées de celles des acides aminés initiaux à l'aide d'une base de données en ligne qui recense les mutations possibles et calcule les conséquences au niveau structural et fonctionnel d'une mutation ponctuelle ([www.russelllab.org/](http://www.russelllab.org/)) (Betts and Russell 2003) (**Figure 34**). Pour toutes les mutations étudiées, la propriété des chaînes latérales des acides aminés a été modifiée en passant de polaire à apolaire ou inversement. Ces modifications ont donc une probabilité importante d'affecter la structure ou la fonction de la protéine, mais également sa stabilité. Avant d'identifier les effets des mutations sur les tissus internes, et plus particulièrement sur le cortex, nous avons étudié la structure de la protéine *SHR1* et estimé les conséquences que pourraient engendrer ces mutations.

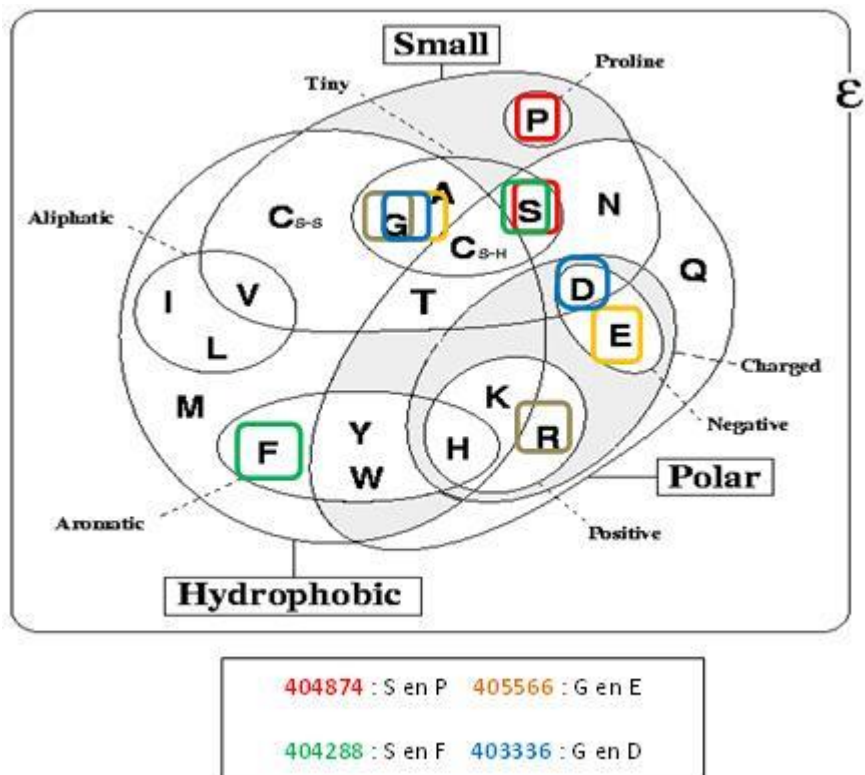


Figure 34 : Substitution des acides aminés pour les lignées TILLING

### II.1.1 Etude de l'effet des mutations TILLING sur la structure de la protéine OsSHR1

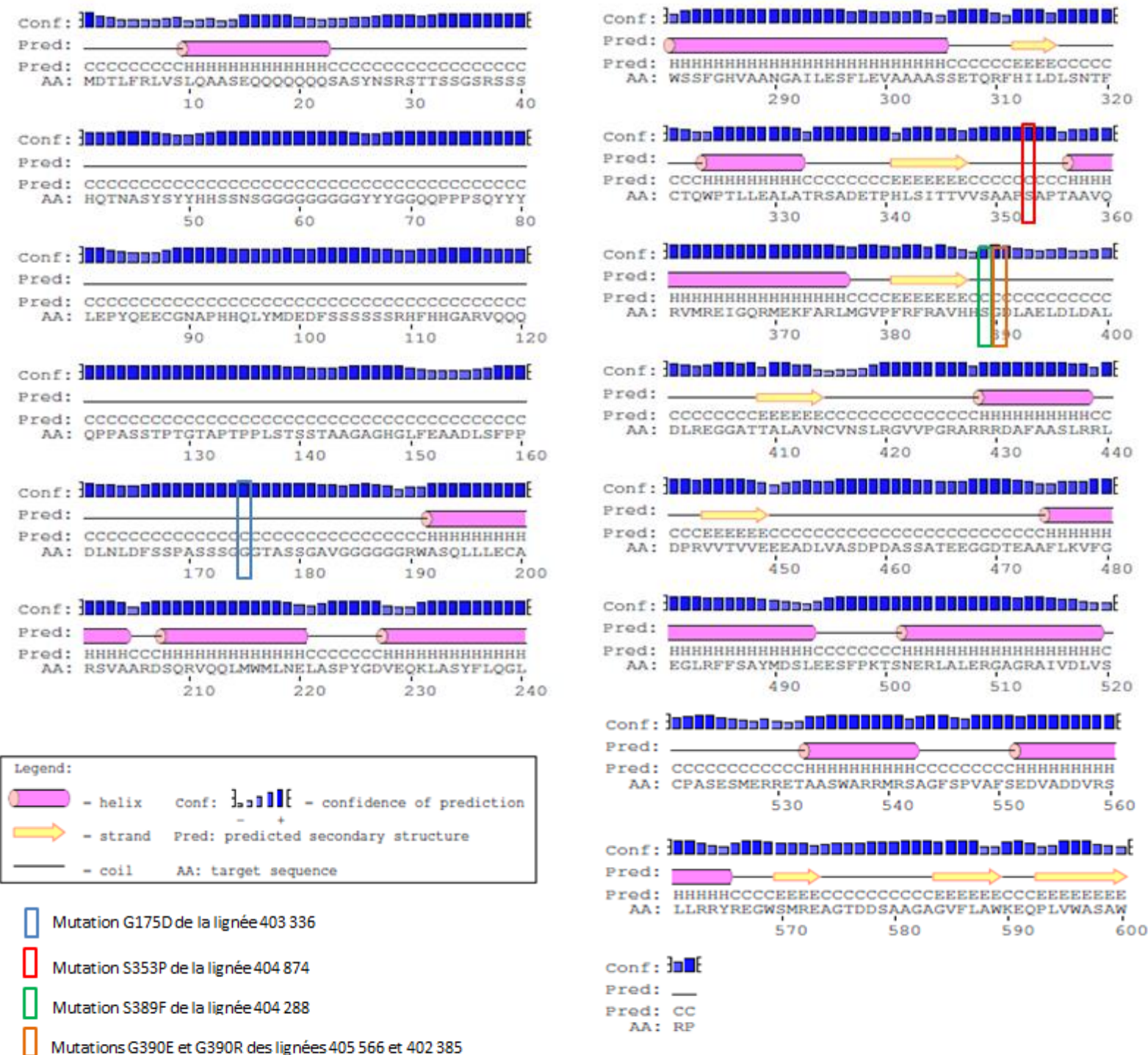
- **Analyse structurale de la protéine**

La protéine OsSHR1 est une protéine de 601 acides aminés, caractérisée par un domaine conservé, appelé GRAS, occupant les deux tiers de la protéine en position C-terminale. Les 190 premiers acides aminés correspondent à la zone la plus variable parmi les orthologues SHR, qui a aussi la particularité de présenter des motifs dits en désordre ou « chaotiques » (**Annexe 11**). Cette région est donc considérée comme une zone intrinsèquement désordonnée, qui confère à la protéine une absence de structure tridimensionnelle stable. Cette situation est fréquente chez les facteurs de transcription pour lesquels l'activité de régulation transcriptionnelle est corrélée à un niveau élevé de résidus promoteurs de désordre dans les zones spécifiques de liaison à l'ADN ou dans les régions d'activation. Ces zones intrinsèquement désordonnées leur confèrent une meilleure plasticité pour leurs interactions avec différents éléments cis-régulateurs (Liu, Perumal et al. 2006). Il existe plusieurs techniques permettant de modéliser la structure tridimensionnelle d'une protéine, la plus connue étant la modélisation par homologie. Cette méthode consiste à utiliser les structures tridimensionnelles résolues de protéines homologues comme modèle pour la structure tertiaire de la protéine d'intérêt. Cependant une seule protéine GRAS dispose d'une structure 3D aujourd'hui, mais sa séquence présente si peu de similarité (28%) avec la protéine SHR qu'elle ne peut être utilisée comme modèle. La technique *ab initio* donne la structure 3D d'une protéine à partir des informations contenues dans la séquence d'acides aminés. Le serveur en libre accès Robetta donne accès à ces structures 3D (<http://robeta.bakerlab.org/>). Cependant le temps d'attente s'est avéré trop long, et aucune structure n'a pu être obtenue à temps pour être présentée dans ce manuscrit. Ni la modélisation par homologie, ni la technique *ab initio* n'ont permis de modéliser la protéine SHR1. Néanmoins, la structure secondaire de la protéine est facilement modélisable. De nombreux logiciels en libre-service permettent de faire une prédiction de ces structures, basée sur la probabilité qu'un enchaînement d'acides aminés se retrouve dans une hélice  $\alpha$ , un feuillet  $\beta$  ou un repliement. Nous avons pu avoir accès à une prédiction de structure secondaire pour la protéine SHR1 grâce au logiciel psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (**Figure 35**).

- **Fonctions des domaines GRAS de la protéine**

Afin d'évaluer l'impact des mutations au niveau structurel et fonctionnel de la protéine, nous nous sommes penchés dans un premier temps sur les propriétés fonctionnelles du domaine GRAS, où sont localisées les mutations. Celui-ci est constitué de plusieurs sous-domaines très conservés entre les membres de la famille GRAS (Bolle 2004). Une étude réalisée sur *Arabidopsis thaliana* a mis en évidence des propriétés spécifiques





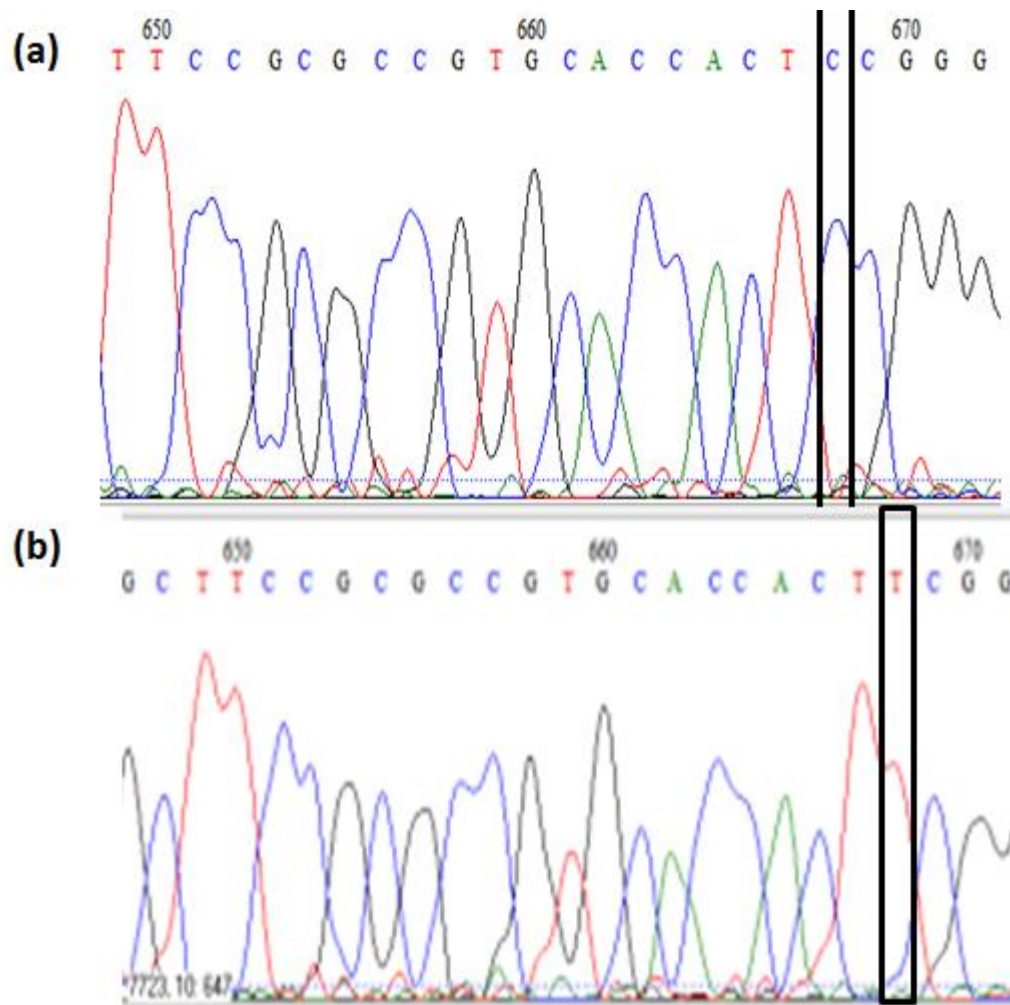
**Figure 35 : Prédiction des structures secondaires de la protéine OsSHR1**

(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Positionnement des mutations ponctuelles des lignées TILLING dans les zones de repliements.

pour chacun d'entre eux, dépendantes de quelques résidus dans chacun des domaines (Gallagher and Benfey 2009). Sachant que les similarités de séquences s'élèvent à plus de 50% entre les protéines de riz et d'AtSHR, on peut supposer une conservation de ces propriétés. Les domaines Leucine Heptad Repeat (LHR), tel que leur nom l'indique, comportent beaucoup de leucines. Chez *A.thaliana* ces domaines sont impliqués dans la mobilité de la protéine. La modification du motif LNELDV en position 341 par un motif poly-alanine AAA engendre une réduction de la localisation nucléaire de la protéine et une absence de son mouvement jusqu'à l'endoderme. Les leucines de ce motif sont conservées chez le riz en position 398 et 401 pour SHR1 et 402 et 405 pour SHR2 (**Annexe 12**). Les domaines VHIID et PFYRE ont été identifiés comme impliqués dans le mouvement et l'activité de la protéine SHR. En effet, la délétion de ces domaines entraîne la perte de mobilité de la protéine. De plus, la thréonine du domaine VHIID située en position 289 est nécessaire à son activité. Cette propriété est conservée chez le riz, puisque la mutation de cette thréonine située en position 344 chez SHR1 et 351 pour SHR2 (**Annexe 12**) entraîne le même résultat que chez *A.thaliana*, à savoir une perte de mobilité de la protéine et une perte de sa localisation nucléaire (Wu, Lee et al. 2014). Le domaine SAW et la zone spécifique située en N-terminale participent à la stabilité de la protéine. Les mutations ponctuelles présentes chez les lignées TILLING pourraient donc perturber cette stabilité en introduisant des acides aminés aux propriétés chimiques différentes, rendant plus difficile son changement de conformation repliée à dénaturée (Shoichet, Baase et al. 1995).

- **Effets des mutations TILLING sur la protéine**

Nous avons pu localiser les mutations ponctuelles des lignées TILLING dans les différents motifs. Ces mutations se situent toutes au niveau de zones de repliement dans le domaine GRAS, exceptée la mutation G175D de la lignée 403 336 qui est localisée dans la partie spécifique et désordonnée de la protéine (**Figure 35**). Ne disposant pas de structure 3D de la protéine SHR1, il nous est impossible d'estimer l'impact de ces mutations sur son repliement tridimensionnel. Cependant il existe des outils permettant d'estimer les modifications de la stabilité d'une protéine présentant des mutations ponctuelles, tel que l'INPS (Impact of Non-synonymous mutation on Protein Stability) (Fariselli, Martelli et al. 2015). Cet outil permet d'évaluer l'impact de mutations ponctuelles sur des protéines sans structure 3D en estimant la perte ou le gain d'énergie libre (enthalpie) généré par la modification d'un acide aminé. Les trois mutations ponctuelles situées dans le domaine LHR2 entraînent une augmentation de la stabilité, avec un gain d'enthalpie respective de 0,94 kcal/mol ; 0,29 kcal/mol et 0,63 kcal/mol ; tandis que la lignée 404 874, présentant une mutation située dans le domaine VHIID, engendre une baisse de stabilité avec une diminution de 0.23 kcal/mol de l'enthalpie. Quant à la mutation dans le domaine spécifique, elle n'engendre quasi aucune différence de stabilité, avec une diminution de 0.04 kcal/mol.



**Figure 36 : Chromatogramme de deux individus de la lignée TILLING 404 288.** La mutation est visible en position 1166 où la tyrosine est substituée par une cystéine.

(a) Individu ségrégant nul où aucune substitution n'est repérée

(b) Individu homozygote où on voit bien la tyrosine qui a remplacé une cystéine

**Tableau 6 : Critères de phénotypage en serre des lignées TILLING**

Phénotype aérien	Phénotype racinaire
Taille de la plante	Masse racinaire (échelle de 0 à 2)
Longueur de la tige	0 : système racinaire très réduit
Nombre de talles	1 : système racinaire normal (WT)
Longueur de la panicule	2 : système racinaire très développé
Enroulement des feuilles	3 : Système racinaire en touffe

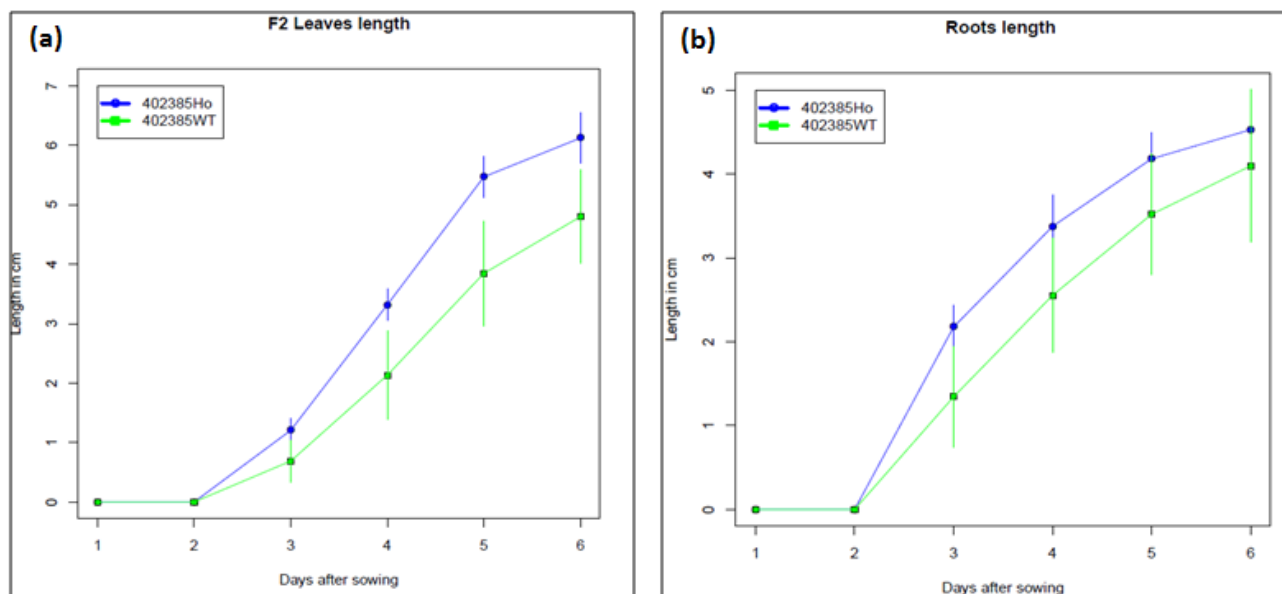
Les perturbations provoquées par les mutations ponctuelles sont faibles, mais cela ne signifie pas pour autant qu'elles sont sans effet. C'est la raison pour laquelle nous avons effectué un phénotypage de ces lignées, afin d'identifier l'impact de ces mutations sur le développement de la plante et sur l'anatomie racinaire.

### II.1.2 Vérification des mutations par séquençage

La première étape a été de vérifier par séquençage la présence des mutations indiquées par l'UC Davis. Ceci a été réalisé sur les plantes de la génération T1. Pour chacune des lignées nous avons identifié des plantes homozygotes (Ho), hétérozygotes (He) et des plantes ne portant pas la mutation, appelées ségrégant nul (SN). Des couples de primers ont été identifiés de part et d'autre de chacune des mutations, afin de pouvoir séquencer les amplicons et de vérifier la présence de la mutation. Nous avons confirmé les mutations et identifié au moins 3 individus homozygotes par lignée ainsi que des ségrégants nuls (SN) (**Figure 36**).

### II.1.3 Phénotypage des lignées TILLING

Les plantes en génération T1 ont été phénotypées en serre selon les critères décrits dans le **Tableau 6**. Aucun phénotype aérien ou racinaire particulier n'a été remarqué. Afin d'effectuer un phénotypage plus poussé de chaque lignée TILLING, un protocole expérimental décrit dans le Matériel et Méthode (cf. p.204) a été mis en place sur la descendance des individus homozygotes et ségrégants nuls identifiés au séquençage : un suivi de croissance et un phénotypage microscopique racinaire ont été réalisés sur les plantules. A partir de ces données nous avons voulu savoir si les mutations ponctuelles avaient des effets sur le développement racinaire (croissance et/ou anatomie). Nous avons donc comparé les résultats obtenus entre les individus mutés à l'état homozygote et leurs ségrégants nuls. Cependant, l'application d'un agent mutagène, tel que c'est pratiqué dans la production de lignées TILLING, engendre des mutations partout dans le génome. Il est donc important de vérifier que les effets observés chez les lignées TILLING *SHR1* soient bien dus aux mutations ponctuelles étudiées et non aux autres mutations. Pour ce faire, nous avons aussi comparé, pour chacun des paramètres établis, des SN de chaque lignée avec la variété sauvage *Nipponbare*. Dans la suite de cette étude, nous désignerons par effet « TILLING », les phénotypes engendrés par des mutations autres que celles présentes dans *SHR1* (toutes les mutations dans le génome provoquées par le traitement à l'agent mutagène), par opposition à l'effet « mutation » qui correspond aux mutations ponctuelles des cinq lignées analysées dans le gène *SHR1*.



**Figure 37 : Graphique de comparaison des croissances foliaires et racinaires**

Croissances foliaire (a) et racinaire (b) entre les individus 402385 Ho et WT. Les individus Ho ont une croissance foliaire accélérée dès le 3<sup>ème</sup> jour de culture.

**Tableau 7 : Liste des paramètres pour le phénotypage racinaire des lignées TILLING**

lignée	échantillon	Nombre de cellules d'endoderme	Nombre de cellules d'Inner-Cortex	Nombre de divisions périclinales de l'endoderme	Nombre de divisions anticlinales de l'endoderme	Nombre de divisions anticlinales de l'Inner-cortex
		NCE	NCIC	NDPE	NDAE	NDAIC
A	Ho					
	SN					
	NB					

**Tableau 8 : Effets des mutations ponctuelles des lignées TILLING sur les paramètres anatomiques.** (test Newman et Keuls, n=30,  $\alpha=0.05\%$ )

variété	NCE	NC1	NDPE	NDAC
405566_HO	23,3 c d	22,3 bc	0,3 b	0,63a
405566_WT	24,3 b c	22,1 bcd	0,87 ab	0,27 b
402385_Ho	25,1 b	22,7 ab	1,13 ab	0,16b
402385_WT	26,4 a	23,2 a	0,37 b	0,03b
403336_HO	24 b c	21,2 ef	0,63 ab	0,0 b
403336_He	24 bc	21,5 cdef	0,3 b	0,06b
404288_HO	24,7 b	21,6 cde	1,33 a	0,02b
404874_HO	22,7 d	21,3 def	0,77 ab	0,0b
404874_WT	22,8 d	20,7 f	0,23 b	0,0b
NB	24,22 bc	21,7 cde	0,4b	0,06b

- **Seule la mutation G 1168 A à un effet sur la croissance aérienne des plantules**

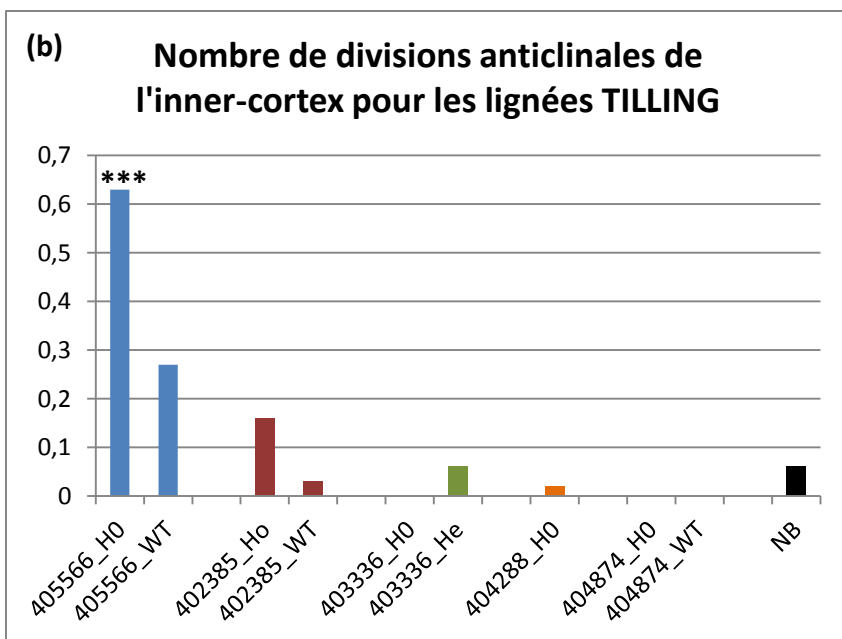
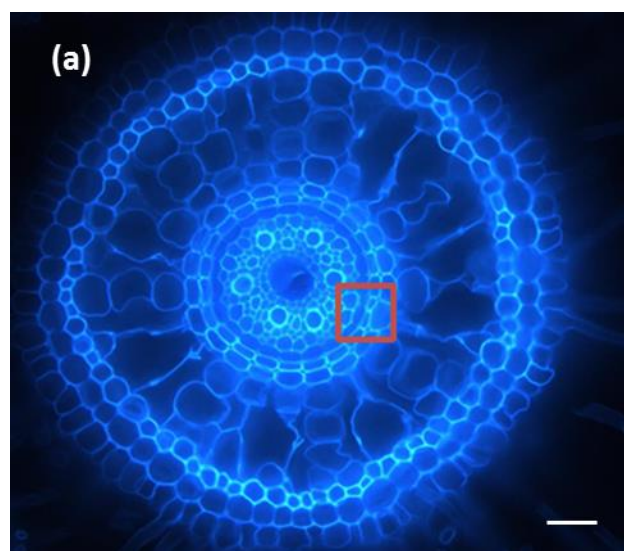
Les mesures de croissances foliaire et racinaire de chaque lignée ont été comparées entre les individus homozygotes et leurs ségrégant nuls. Un script sur le logiciel R a été réalisé pour analyser les suivis de croissance. Ce script calcule les moyennes des croissances quotidiennes pour les individus Ho d'une lignée, leurs SN mais aussi pour *Nipponbare* (utilisé comme témoin), et illustre les résultats sous forme graphique. Pour conclure, nous avons remarqué que seule la lignée 402 385 (mutation ponctuelle G 1168 A) présentait une différence significative de croissance : les individus Ho ont une croissance foliaire plus rapide que leur SN (lui-même ayant une croissance semblable à celle de *Nipponbare*) (**Figure 37**). Cependant cette tendance disparaît à l'âge adulte, pour lequel aucune lignée ne se distingue par sa taille.

- **Seules les lignées 405 566 et 402 385 présentent des modifications de leurs anatomies racinaires**

Le phénotypage de l'anatomie racinaire a été réalisé pour l'ensemble des coupes selon les critères décrits dans le **Tableau 7**. Suite à ces résultats nous avons effectué des tests statistiques pour mettre en évidence de potentiels effets mutations. Nous avons dans un premier temps réalisé un test ANOVA (analyse de variances) entre deux jeux de populations : d'abord entre les individus Ho et leur SN pour mettre en évidence l'effet des mutations ponctuelles (effet mutation), et aussi entre les SN et *Nipponbare*, pour mettre en évidence des effets dus à des mutations non liées aux mutations ponctuelles dans *SHR1* (effet « TILLING »). Ces résultats ont été suivis par un test de comparaison multiple (test de Newman et Keuls), qui permet d'identifier pour chacun des critères quelles sont les populations qui présentent des différences significatives (seuil de 0.05%). Pour compléter l'analyse, la technique des contrastes a été utilisée afin de comparer l'ensemble des lignées TILLING pour tous les paramètres. Les tests statistiques ont réalisés à l'aide du logiciel SAS (Etats-Unis).

Le test ANOVA a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les lignées pour deux paramètres, qui sont le nombre de cellules d'endoderme (NCE) et le nombre de divisions anticlinales de la couche d'inner-cortex (NCAIC). Les tests complémentaires de Newman et Keuls et des contrastes ont permis d'identifier les lignées TILLING pour lesquelles les mutations ponctuelles provoquaient des effets significatifs (**Tableau 8**). En effet, le NCAIC est multiplié par 2.3 chez les individus portant la mutation G 1169 A (lignée 405 566) (**Figure 38**), et le NCE est diminué de 5% chez la lignée mutée 402 385 (mutation G 1168 A). Afin de vérifier que les modifications anatomiques observées étaient bien dues aux mutations ponctuelles dans la protéine SHR1 et non à d'autres mutations dans le génome (provoquées par la mutagénèse), nous avons analysé l'effet TILLING pour chacune de ces lignées. En comparant les SN de chaque lignée avec la variété sauvage *Nipponbare* pour tous paramètres anatomiques, il s'est avéré que l'application de l'agent mutagène entraînait des modifications dans la plante indépendamment de la mutation : le NCE, et le nombre de cellules d'inner-cortex (NCIC) est augmenté chez la lignée





**Figure 38 : Augmentation du NDAIC provoqué par la mutation ponctuelle G 1169 A chez la lignée 405 566.**

(a) photo en autofluorescence d'une plante Ho de la lignée 40556 avec une NDAC. Barre =25µm

(b) test de Newman et Keuls pour le critère NDAC (moyenne de la fréquence d'apparition de NDAIC en fonction des lignées, n=30 pour chaque lignée,  $\alpha=0.05\%$ )

**Tableau 9 : Effets de la mutagenèse sur les lignées TILLING, pour différents paramètres anatomiques. (test Newman et Keuls, n=30,  $\alpha=0.05\%$ )**

variété	NCE	NC1	NDPE	NDAE	NDAC
405566_H0	23,3 c d	22,3 bc	0,3 b	1,5b	0,63a
405566_WT	24,3 b c	22,1 bcd	0,87 ab	2,34 ab	0,27 b
402385_Ho	25,1 b	22,7 ab	1,13 ab	2,53 ab	0,16b
402385_WT	26,4 a	23,2 a	0,37 b	3,17a	0,03b
403336_H0	24 b c	21,2 ef	0,63 ab	2,73 a	0,0 b
403336_He	24 bc	21,5 cdef	0,3 b	2,6 ab	0,06b
404288_H0	24,7 b	21,6 cde	1,33 a	3,0 a	0,02b
404874_H0	22,7 d	21,3 def	0,77 ab	1,47b	0,0b
404874_WT	22,8 d	20,7 f	0,23 b	2,07 ab	0,0b
NB	24,22 bc	21,7 cde	0,4b	2,44 ab	0,06b



402 385 et diminué chez la lignée 404 874. Le NDPE est multiplié par 3 chez la lignée 404 288, comparé à *Nipponbare*. Pour cette lignée, ne disposant pas de SN, les comparaisons sont effectuées entre les Ho et la variété sauvage, et de ce fait, l'effet de la mutation dans SHR1 est difficilement interprétable (**Tableau 9**).

## II.1.4 Conclusion

- **Deux mutations pour un même acide aminé engendrent deux phénotypes différents**

La comparaison entre les individus Ho et leurs SN ont permis de mettre en évidence que deux des mutations ponctuelles dans SHR1 engendraient des modifications anatomiques significatives de la racine. Ces deux mutations touchent le même acide aminé. La lignée 405 566 présente une mutation de la glycine en glutamate (mutation nucléotidique G 1169 A), tandis que la lignée 402 385 présente une mutation de cette même glycine en arginine (mutation nucléotidique G 1168 A). La glycine mutée est localisée dans le domaine GRAS conservé de la protéine SHR1, au niveau du domaine LHR2. Selon le changement de l'acide aminé, les répercussions sur l'anatomie racinaire de la plante varient. En effet, le changement en glutamate (chez la lignée 405 566), qui est un petit acide polaire négatif ayant la capacité de mimer une phosphorylation, provoque l'augmentation des NDAC ; alors que l'arginine (lignée 402 385), le plus basique des acides aminés polaire et chargé positivement, engendre la diminution des NCE. Ainsi, deux mutations d'un même acide aminé engendrent des effets totalement différents. La mutation se situe en position 390 de la séquence protéique et se trouve au niveau d'une zone de repliement entre deux feuillets (**Figure 30**). La protéine *SHR1* étant à structure désordonnée (cf. II.1.1), elle n'a pas de structure 3D stable. Nous ne pouvons donc pas anticiper ni évaluer les modifications structurelles engendrées par les nouveaux acides aminés formés.

- **Les phénotypes observés ne sont pas seulement dus aux mutations ponctuelles**

Des effets TILLING ont été identifiés pour les deux lignées 402 385 et 404 874. Cela signifie que l'application de l'agent mutagène a provoqué d'autres mutations dans le génome que celles étudiées, et qu'elles engendrent aussi des conséquences sur l'anatomie racinaire. Dans le cas où l'effet TILLING et l'effet mutation ponctuelle n'engendrent pas les mêmes phénotypes, on peut considérer la mutation ponctuelle comme entièrement responsable du phénotype observé. Dans le cas inverse où les deux effets produisent le même phénotype, et même si les modifications sont statistiquement significatives, les interprétations sont plus délicates, et nécessiteraient des analyses supplémentaires.

Dans la lignée 402 385 nous avons remarqué un effet TILLING : les SN (individus ne portant plus la mutation ponctuelle) présentent plus de cellules d'endoderme et de cortex qu'une plante n'ayant subi aucun traitement. Cela signifie donc que le traitement à lui seul a eu un effet. Cet effet TILLING produit l'effet inverse de la mutation ponctuelle, puisque cette



dernière engendre une diminution du nombre de cellules d'endoderme chez les individus Ho. Nous pouvons donc conclure que la mutation ponctuelle G 1168 A est bien responsable du phénotype observé (diminution des NCE). La glycine en position 1168 serait donc impliquée dans la régulation des divisions des cellules endodermes.

La lignée 404 874 ne présente aucune différence statistique entre les Ho et les SN (pas d'effet de la mutation ponctuelle), cependant il y a effet TILLING notable, puisque les SN présentent une diminution significative du nombre de cellules d'endoderme (NCE) et de cortex (NCIC). En revanche aucun impact n'a été observé pour le nombre de divisions anticlinales de ces deux couches. Le traitement a donc engendré d'autres mutations responsables de ce phénotype, qui pourrait être dû à une diminution du nombre de divisions des initiales à l'origine des différentes couches.

- **L'analyse des lignées TILLING fournissent des informations quant au rôle de SHR1 dans la mise en place des tissus racinaire**

A ce stade ces résultats semblent confirmer que la protéine SHR1 aurait un rôle dans l'établissement des tissus racinaires : deux mutations ponctuelles dans le domaine conservé perturbent leurs organisations.

La mutation G 1168 A (lignée 402 385) diminue le nombre de cellules d'endoderme. Cette diminution du nombre de cellules d'endoderme pourrait provenir d'une baisse du nombre de divisions anticlinales des cellules endodermes ou d'une baisse d'activité de l'initiale. Cependant aucune diminution significative des divisions anticlinales de l'endoderme, ou du nombre de cellules du cortex n'a été observée. On peut donc faire l'hypothèse que cette mutation inhiberait les divisions anticlinales précoces de l'endoderme. En revanche, la mutation G 1169 A (lignée 405 566) augmente les divisions anticlinales anormales de la dernière couche de cortex. Aucune autre modification n'a été observée dans cette lignée. Cette glycine pourrait être impliquée également dans la régulation des divisions tardives du cortex.

- **Perspectives**

Pour confirmer le lien entre les mutations dans le gène *SHR1* et les phénotypes microscopiques observés, il est nécessaire de poursuivre l'analyse de ces lignées. Tout d'abord il faudrait identifier la nature de ces mutations, autrement dit savoir s'il s'agit de mutations récessives ou dominantes. Il sera donc nécessaire d'effectuer des croisements entre les individus Ho et des plantes sauvages. Si le phénotype de la génération T1 présente le même que celui du parent Ho alors la mutation est dominante, si non alors il s'agit d'une mutation récessive. De plus, ces rétrocroisements permettraient également de nettoyer le fond génétique de ces lignées et donc de diminuer les effets TILLING.

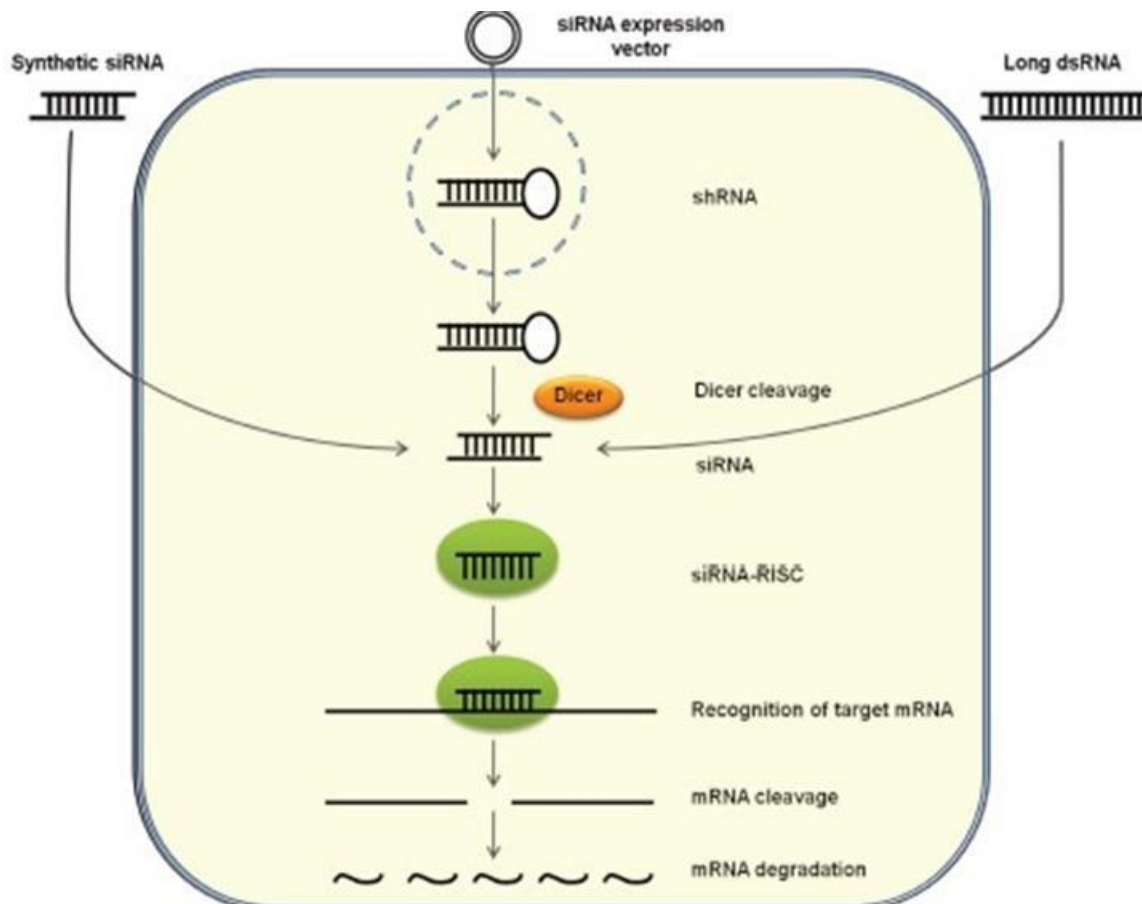
Suite à cela, il reste à prouver que le phénotype observé est bien dû à la mutation ponctuelle dans le gène. Plusieurs techniques sont envisageables :



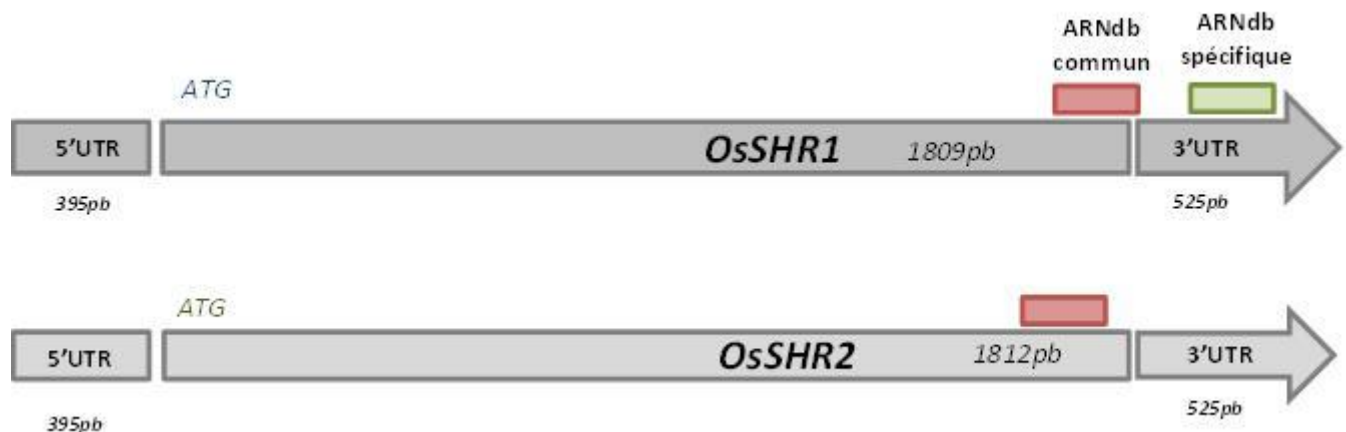
- Une complémentation de ces lignées avec le gène *SHR1*. Si le phénotype sauvage est restauré alors la mutation ponctuelle était bien responsable du phénotype.
- Une technique plus rapide et plus riche en informations serait de croiser deux individus Ho des lignées 405 566 et 402 385 ensemble. Au stade F1, si un phénotype sauvage est observé alors aucune de ces deux mutations n'est responsable du phénotype qui lui était attribué. Dans le cas où les deux mutations sont de même nature (dominante ou récessive), si un seul des phénotypes est observé alors seule la mutation représentée serait bien responsable du phénotype. Si les deux phénotypes sont observés alors il y aurait un effet additif et la preuve d'une corrélation entre les phénotypes et les mutations.

Une autre piste à poursuivre dans l'étude de ces TILLING serait de comparer les localisations des protéines *SHR1* par immunolocalisation entre les plantes mutées et les SN, de façon à savoir si la mutation pourrait perturber l'adressage ou la mobilité de la protéine. En effet, on sait que chez *A. thaliana* la mutation de la thréonine en isoleucine en position 189 inhibe la localisation nucléaire de la protéine et abolit sa mobilité (Gallagher, Paquette et al. 2004).

Les effets de ces mutations sont faibles, et ne nous permettent pas à ce stade de conclure quant à la fonction de *SHR1*. Ces résultats viendront en compléments de ceux obtenus lors de l'analyse des mutants perte de fonction. Néanmoins, il semble que *SHR1* soit impliqué dans le contrôle des divisions radiales de l'endoderme et anticlinales du cortex. Ces effets subtils pourraient être causés par une mobilité affectée de *SHR1*.



**Figure 38 : Schéma du processus d'interférence à ARN**, avec le procédé de dégradation de l'ARNm après reconnaissance par le complexe RISC. (Singhania, Khairuddin et al. 2012)



**Figure 39 : Position des transgènes RNAi sur les gènes *SHR***

L'ARNdb commun se situe en fin de séquence codante pour les deux gènes *SHR* (rouge), et l'ARNdb spécifique est situé dans le 3'UTR pour *SHR1* (vert).

## III. 2 Lignées transgéniques perte de fonction (Knock-down et Knock-out)

Le criblage de la population TILLING a permis de mettre en évidence des phénotypes faibles causés par des mutations ponctuelles dans le domaine conservé de la protéine SHR1. Cependant, aucun mutant perte de fonction n'a été obtenu par cette technique. Nous avons cherché à produire des lignées transgéniques perte de fonction en utilisant des techniques alternatives.

### III.2.1 Technique de l'interférence ARN

La génération de mutants RNAi est un processus utilisé pour créer des mutants d'expression « knock-down » (Hamilton and Baulcombe 1999; Singhania, Khairuddin et al. 2012) (**Figure 38**). Cette technique a été mise en place au laboratoire dans les années 2000, et appliquée aux gènes *OsSHR1* et *OsSHR2* par JC Breitler. Ce dernier a créé des lignées RNAi pour les gènes *OsSHR1*, *OsSHR2* ainsi qu'une lignée ciblant les deux gènes en même temps, dont la caractérisation a été effectuée au début de cette thèse.

- **Identification des séquences cibles**

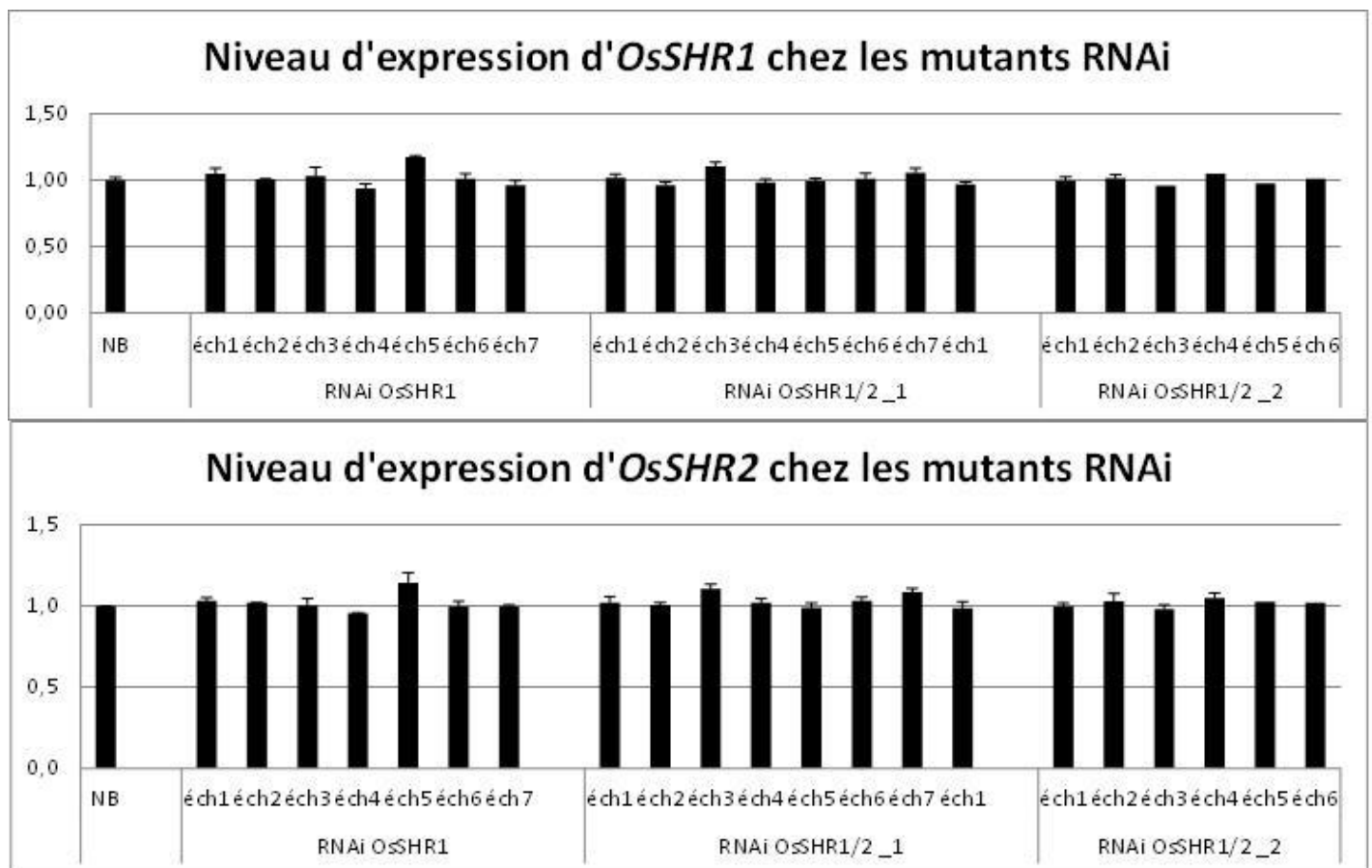
Plusieurs zones spécifiques de 150 pb à 180 pb ont été choisies pour les gènes *SHR*. Une séquence commune aux deux gènes a été sélectionnée, située à la fin de la séquence codante (proche du 5'UTR), et une deuxième séquence spécifique à *OsSHR1* uniquement (dans le 3'UTR du gène) (**Figure 39**). Suite à la transformation génétique, très peu de plantes ont été générées et les survivantes ont présenté des problèmes de stérilité. C'est la raison pour laquelle peu de lignées ont pu être analysées.

- **Aucun phénotype n'a été observé chez les mutants RNAi**

Sur les plantes générées, seulement quatre lignées présentaient un stock de graines suffisant permettant de faire des analyses. Sur ces quatre lignées, deux correspondaient à la cible commune *OsSHR1/2*, et deux à la cible unique *OsSHR1*. Les plantes ont été phénotypées en génération T1 à la serre selon les mêmes critères que ceux établis pour l'analyse des lignées TILLING (**Tableau 5**). Un phénotypage racinaire des plantules âgées de 6 jours en génération T2 a également été effectué. Aucun phénotype (macroscopique ou microscopique) n'a été relevé pour les lignées analysées.

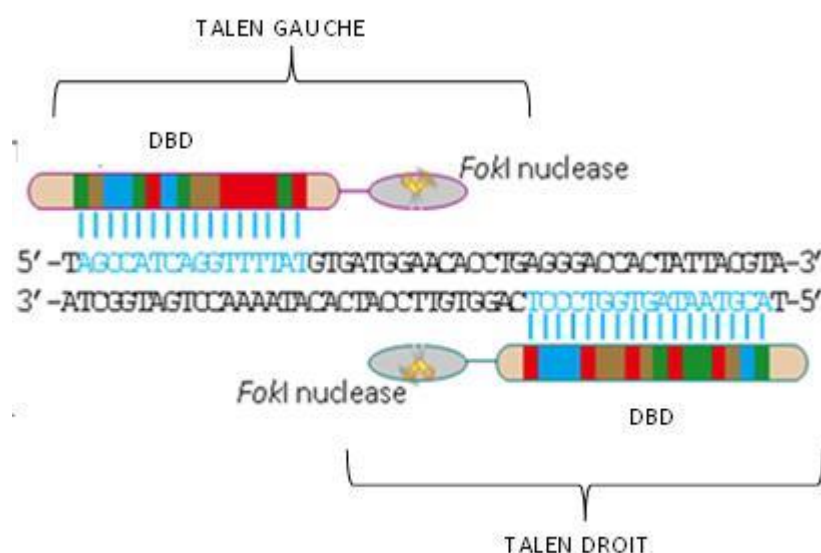
Afin de savoir si l'interférence ARN avait fonctionné dans ces plantes, nous avons étudié le niveau d'expression des deux gènes *SHR* dans chacune de ces plantes par qRT-PCR. Les primers spécifiques des gènes, localisés dans les parties 3'UTR ont été utilisés, et n'ont mis en évidence aucune modification d'expression (**Figure 40**). Les plantes régénérées ont donc un phénotype racinaire sauvage et un niveau d'expression des gènes *SHR* semblable à *Nipponbare*. Il est donc possible que les plantes dont le niveau d'expression était affecté par la présence du RNAi n'aient pas pu régénérer. Cela pourrait expliquer aussi le faible nombre de plantes obtenues.





**Figure 40 : Analyse des niveaux d'expression des gènes endogènes *OsSHR1* et *OsSHR2* par qRT-PCR sur les échantillons des trois lignées mutants RNAi (cible *SHR1*, cible commune *SHR1 & SHR2*, cible *SHR2*) (n=2 répétitions)**

- (a) Niveau d'expression invarié d'*OsSHR1* chez les lignées RNAi.  
 (b) Niveau d'expression invarié d'*OsSHR2* chez les lignées RNAi.



**Figure 41 : Schéma de la liaison à l'ADN d'un TALEN**

## II.2.2 Technologie TALEN

La technique des ARN interférents n'ayant pas fourni de mutant présentant de baisse voire d'extinction de l'expression des gènes *SHR*, nous avons opté pour la technologie TALEN (Transcription activator-like effector nuclease). Cette technologie récente permet de modifier le génome au niveau de zones spécifiques. Elle est dérivée d'un mécanisme d'infection du riz par la bactérie *Xanthomonas sp.* Cette bactérie est capable de sécréter des effecteurs de pathogénicité appelé les Transcription Activator Like (TAL) dans les cellules de la plante infectée. La technologie des TALEN s'inspire de ce mécanisme avec la présence d'un TAL fusionné à une endonucléase engendrant des coupures double brins dans l'ADN appelée la Fok I (**Figure 41**). Cette enzyme artificielle (domaine de liaison couplé à une endonucléase) a donc la capacité de cliver l'ADN au niveau d'une séquence spécifique et d'engendrer un mécanisme de réparation de l'ADN par jonction d'extrémités non-homologues (Non-Homologue End-Joining, NHEJ). La réparation des cassures de type NHEJ lie entre eux les deux doubles brins libres d'ADN, en causant des erreurs dans le génome par le biais de délétions ou d'insertion de quelques bases, entraînant la modification du génome.

- **Réalisation de deux constructions TALEN dirigés contre les gènes *SHR***

L'endonucléase Fok I possède deux domaines qui fonctionnent sous forme de dimère. Il est donc nécessaire d'utiliser deux constructions avec des domaines de liaison à l'ADN dirigés contre des sites du génome présentant des orientations tête-bêche et un espacement correct. Le nombre d'acides-aminés entre le domaine TAL et le domaine FokI ainsi que le nombre de bases entre les deux sites de liaison sur le génome sont des paramètres importants pour assurer une bonne activité de l'enzyme chimérique.

Des TALENs « droit » (TALEN d) et « gauche » (TALEN g) ont été dessinés pour les gènes *OsSHR1* et *OsSHR2*. Les sites de reconnaissance des TALENs sont situés à proximité de l'ATG de façon à augmenter les chances d'obtenir une protéine tronquée et donc d'avoir des plantes mutantes perte de fonction (Knock-out, KO) (**Figure 42**). Les TALEN ont été synthétisés par l'entreprise Collectis dans le cadre d'une collaboration (Projet GENIUS) puis sous clonés dans des vecteurs binaires de destination (pC5300 TALEN). Deux types de vecteurs ont été testés, un vecteur qui, en plus de sa propre cassette, contient les deux cassettes des TALENs « droit » et « gauche », ayant chacune un promoteur 35S fusionné à la séquence TAL ciblant chaque séquence SHR, et une nucléase humaine FokI. Le deuxième type de vecteur contient un promoteur unique pCMV et une fusion des deux TALEN droit et gauche séparé par un peptide viral T2A qui permet, à partir de la transcription d'un seul ARN, d'obtenir par « ribosome skipping » la production de deux peptides (TALENg et TALENd) sous le contrôle du même promoteur. La transformation des plantes a eu lieu en mai 2014. Les plantes générées ont été phénotypées et analysées par séquençage afin de détecter d'éventuelles mutations.



Figure 42 : Design de la zone TALEN spécifique pour *OsSHR1*, située juste après l'ATG.

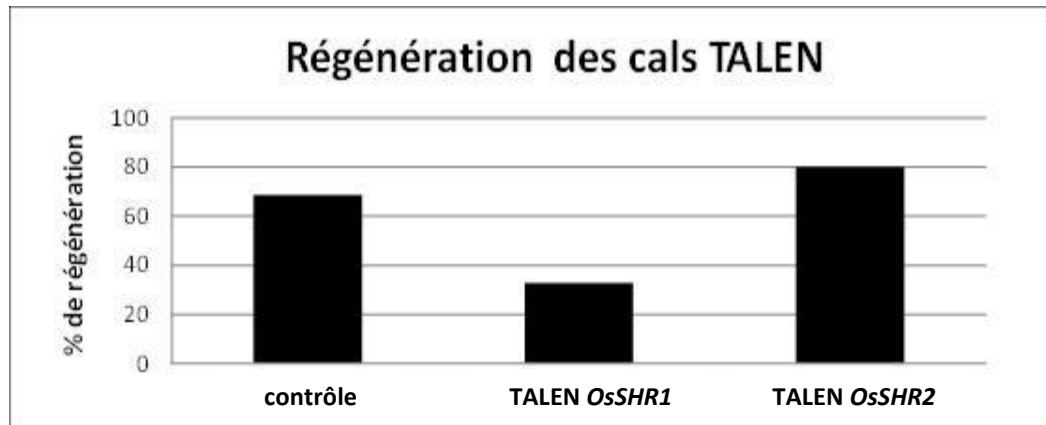


Figure 43 : Fréquence de régénération des cals transformés avec le vecteur TALEN.

Avec comme effectifs 28 plantes pour la lignée contrôle, 26 pour la lignée *SHR1* et 96 pour la lignée *SHR2*. Les cals contenant le vecteur vide (contrôle) présentent une régénération de 68.6% (n=159), tandis que le construit TALEN *OsSHR1* seulement 32.6% (n=79) et 80% pour le construit TALEN *OsSHR2* (n=160).

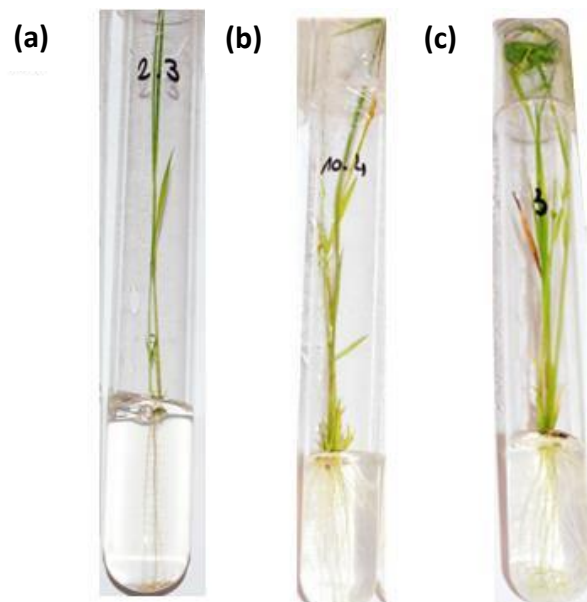


Figure 44 : Phénotypes des lignées TALEN

- (a) phénotype monotalle, et quasi mono-racine, existant chez les lignées TALEN *OsSHR1&2*
- (b) phénotype « Wild-type », existant chez les lignées TALEN *OsSHR1&2*
- (c) lignée contrôle avec le phénotype « Wild-type »

- **Suivi de la régénération des plantes TALEN**

Lors du suivi des cals transformés, nous nous sommes aperçus que les cals TALEN-*SHR1* régénéreraient beaucoup moins bien que les autres construits TALEN. Sur 163 cals initiaux pour les TALEN-*SHR2* et 86 pour les TALEN-*SHR1*, 159 (68% des cals) et 26 (30%) respectivement ont régénérés des plantes (**Figure 43**). En effet, les cals TALEN-*SHR1* semblaient bloqués au stade de régénération, avant l'étape de verdissement. Les cals brunissent et meurent rapidement. Ce problème de régénération diffère de celui observé chez les lignées surexprimeuses, pour lesquelles les cals restent bloquées au stade verdissement. Nous avons donc supposé que l'introduction du TALEN ciblant *SHR1* avait un effet délétère. Les plantes régénérées seraient donc des plantes pour lesquelles le TALEN ne s'exprimerait pas ou peu, ou bien il s'agirait de plantes non transformées. Ces résultats suggèrent également que *SHR1* et *SHR2* n'aient pas la même importance lors de la régénération, hypothèse déjà émise à la suite de l'analyse de la régénération des surexprimeuses.

- **Génotypage et phénotypage des lignées TALEN**

A partir d'extraction ADN des plantes en tube, nous avons dans un premier temps confirmé la présence du transgène par qPCR. Les plantes dont la présence du transgène a été validée (mono ou deux copies) ont été analysées par séquençage afin de vérifier la présence d'une coupure de l'ADN dans la zone cible. Pour cela, des primers ont été dessinés de part et d'autre de la zone spécifique, et l'amplicon a été séquencé. Aucune coupure n'a été observée sur les amplicons séquencés pour toutes ces lignées: l'ADN est donc intact.

Le TALEN-*SHR1* a cependant un effet sur la régénération (taux limité à 32.6%). Ce résultat suggère que le TALEN puisse avoir un effet au niveau des cals, en inhibant la transcription ou la traduction de *SHR*. L'absence du gène ou de sa protéine empêcherait alors toute régénération. Ceci va dans le sens de l'hypothèse émise précédemment qui stipule que ces plantes soient des « échappées », autrement dit il s'agirait de plantes n'ayant subi aucune modification de l'expression de *SHR1*, ni de mutation au niveau de la séquence correspondante.

Un phénotypage des plantes transformées en tube a également été effectué en parallèle des analyses moléculaires. Un phénotype commun aux deux lignées TALEN-*SHR1* et TALEN-*SHR2* a été relevé: Pour les deux lignées, environ 15% des plantes présentent un système racinaire très réduit avec moins de 5 racines, couplé à un monotalle (**Figure 44 a**). Les 85 % restant s'apparentent à des plantes « Wild-type » (**Figure 44 b**). Nous savons que les TALEN n'ont pas provoqué de coupure dans la séquence cible. Le phénotype observé peut donc être dû à la présence du transgène qui aurait un effet au niveau transcriptionnel ou traductionnel (même s'il ne coupe pas), mais il peut aussi être causé par la transformation génétique en soi. Nous avons donc comparé ces plantes à celles de la lignée contrôle (vecteur TALEN sans cible), pour laquelle nous n'avons observé que des phénotypes WT (**Figure 44 c**). Ces résultats signifient donc que la présence du transgène a un effet sur le



phénotype sans pour autant engendrer de coupure. Cela pourrait être expliqué par l'existence d'un effet transcriptionnel ou post-transcriptionnel de la construction TALEN-*SHR*.

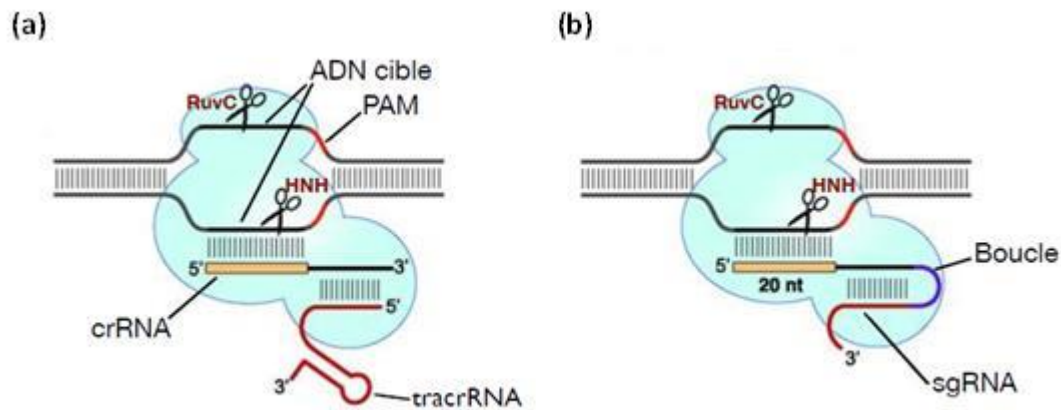
- **Pas de contrôle transcriptionnel par les TALEN-*SHR***

Afin de mettre en évidence l'existence d'un éventuel contrôle transcriptionnel, nous avons regardé l'expression des gènes *SHR1* et *SHR2* dans les plantes transgéniques par qRT-PCR. Pour cela, des extractions ARN suivies d'une reverse transcriptase ont été réalisées sur les échantillons pour lesquels nous disposions de suffisamment de matériel. Les prélèvements ayant été faits sur les plantes en tubes à des stades assez tardifs, les ARN extraits présentaient une mauvaise qualité. Seulement 5 plantes pour la lignée TALEN-*SHR2* et 2 pour la lignée *SHR1* présentaient des ARN de qualité suffisante pour être analysés. L'analyse moléculaire des lignées TALEN est donc loin d'être exhaustive. A l'aide du couple de primers spécifiques des gènes localisés dans la 3'UTR, l'expression des gènes *SHR* de ces plantes a pu être quantifiée. Aucune diminution de l'expression n'a été observée chez ces échantillons. Cette observation est également valable pour les plantes en génération T1 qui ont été analysées au même titre que leurs parents.

Ces résultats suggèrent donc deux hypothèses quant au fonctionnement du TALEN-*SHR1*: soit ce TALEN aurait pu cibler le gène dans les cals et bloquer leur régénération, ce qui expliquerait que les plantes régénérées étudiées ne montrent aucune modification du niveau d'expression des gènes *SHR*, soit il affecterait l'expression d'autres gènes par un effet de bord. Nous pouvons seulement conclure qu'aucune mutation dans le gène *SHR1* n'a pu être observée dans les lignées produites. En ce qui concerne le TALEN *SHR2*, nous n'avons relevé aucun problème de régénération, aucune coupure de la séquence cible ni de modification du niveau d'expression du gène. L'hypothèse la plus plausible serait que le TALEN *SHR2* ne soit pas fonctionnel. D'autres TALEN ciblant d'autres gènes (dans le cadre du projet GENIUS) ont montré un taux d'édition très faible, de l'ordre de quelques pourcents de plantes mutées. De plus les constructions contiennent le promoteur p35S, qui n'est pas un promoteur constitutif optimal chez les monocotylédones. Cette technologie a donc été abandonnée au profit de la technologie CRISPR/Cas9.

### II.2.3 Technologie CRISPR/Cas

Toujours dans le but d'obtenir des mutants pertes de fonctions, le système CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR Associated Protein) a été mis en place. Comme la technologie TALEN, ce système est issu d'un mécanisme de défense naturel existant chez les bactéries et archées-bactéries. Il existe plusieurs types de couples CRISPR-Cas chez ces organismes. Ils sont caractérisés par leur composition en plusieurs protéines capables de cibler et détruire un ADN invasif (S. Makarova, H. Haft et al. 2011). La technologie dérivée de ce système naturel conduit à

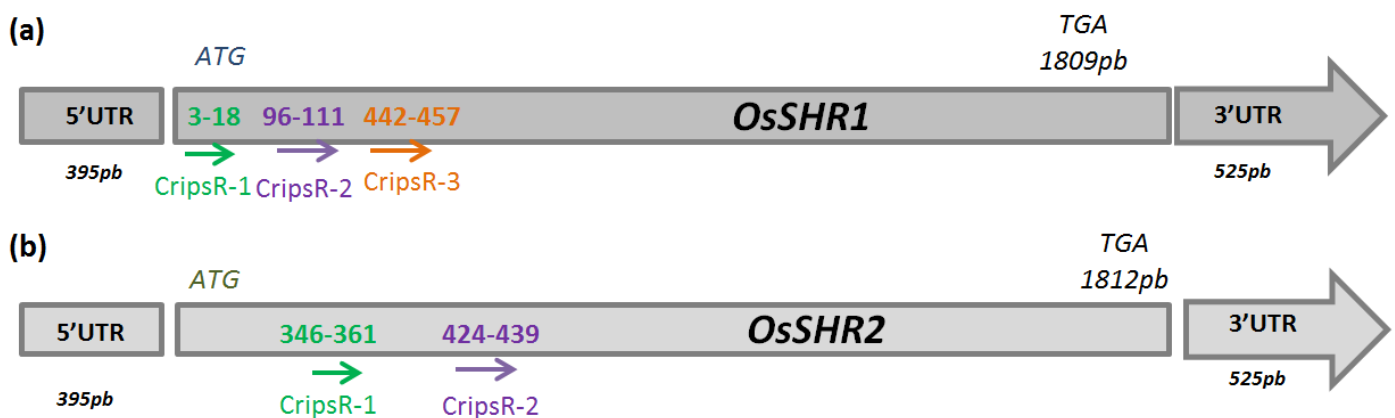


**Figure 45: Ciblage génétique des systèmes CRISPR/Cas9**

(<https://conditionalknockoutmicemodelservice.wordpress.com/2015/04/10/principles-and-applications-of-crisprcas9-system/>)

(a) Le système CRISPR/Cas9 : un ARN CRISPR (crRNA) dont la séquence en 5' est complémentaire de l'ADN cible et la séquence 3' est complémentaire d'un second ARN, transactivateur des CRISPRs (tracrRNA).

(b) Pour simplifier les construits CRISPR/Cas9, le crRNA et tracrRNA ont été remplacés par un ARN chimérique simple guide pour la Cas9 (sgRNA). (Jinek, Chylinski et al. 2012)



**Figure 46 : Schéma des zones cibles des CRISPR/Cas9 dans la séquence codante**

(a) Trois zones identifiées comme spécifiques pour le gène *OsSHR1*, pour lesquelles 3 sgRNA ont été clonés.

(b) Deux zones identifiées comme spécifiques pour le gène *OsSHR2*, pour lesquelles 2 sgRNA ont été clonés.



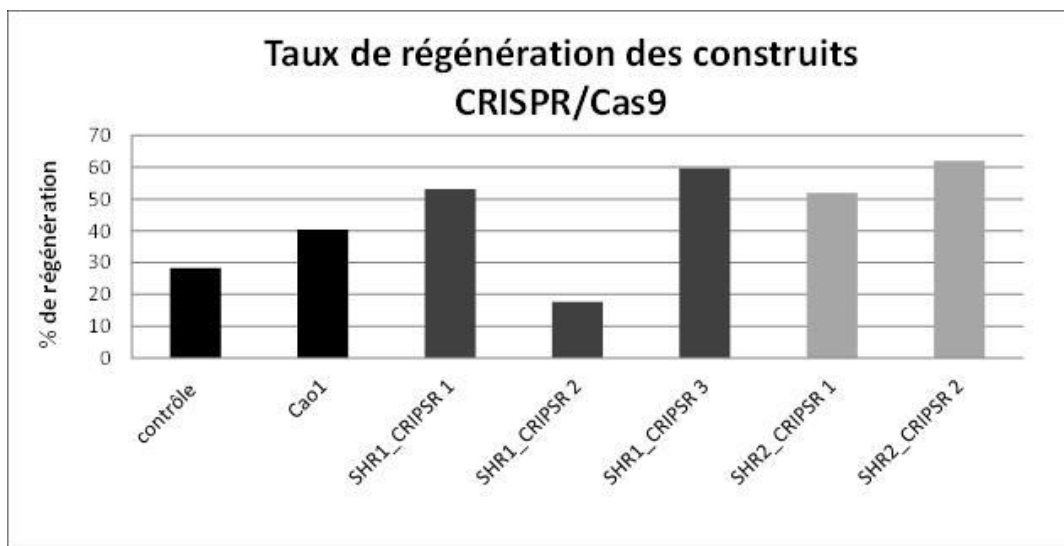
l'édition de génomes. En effet, le système CRISPR-Cas 9 issu de la bactérie *Streptococcus pyogenes* permet la reconnaissance d'une zone spécifique d'ADN par l'intermédiaire d'un petit ARN de séquence variable (crRNA) présentant une similarité de séquence (**Figure 45 a**). Un second ARN dit « trans-activateur » (tracrRNA) se lie en partie 3' de ce crRNA. Le complexe formé par le crRNA, le tracrRNA et la nucléase Cas9 reconnaît la séquence cible d'ADN par l'intermédiaire du crRNA et d'une séquence génomique appelée PAM (Protospacer Adjacent Motif). Le complexe ARN-protéine se lie à la séquence ADN reconnue et induit une cassure double brin. Cette cassure conduit à la réparation de l'ADN par machinerie cellulaire interne, qui est susceptible d'introduire des erreurs dans la séquence en introduisant des mutations. Une simplification de ce système a été réalisée par Jinek et al. (Jinek, Chylinski et al. 2012) qui repose sur la fusion entre les crRNA et tracrRNA afin de former un ARN chimérique appelé ARN guide (single-guide RNA, sgRNA) (**Figure 45 b**). Ce sgRNA permet de guider la protéine Cas9 à la séquence cible d'ADN. Cette technologie est donc plus simple d'utilisation puisque l'expression d'une Cas9 de *S. pyogenes* et d'un sgRNA présentant une similarité de la séquence cible en 5', suffit pour générer une cassure de l'ADN double brin spécifique. La fonctionnalité de la technologie CRISPR/Cas9 a été montrée chez *A.thaliana* (Feng, Mao et al. 2014) ainsi que chez le riz en système protoplastes et *in planta* (Miao, Guo et al. 2013) et chez toutes les espèces procaryotes et eucaryotes testées jusqu'à présent (Gilbert, Larson et al. 2013).

- **Clonage des CRISPR/Cas9**

Afin d'augmenter nos chances d'avoir des mutants perte de fonction pour chacun des gènes *SHR*, nous avons choisi de tester plusieurs sgRNA. Trois cibles différentes ont été dessinées pour *SHR1* et deux pour *SHR2*, toutes situées proches de l'ATG (**Figure 46**). Les séquences des sgRNA ont été identifiées à l'aide du logiciel CRISPR-PLANT ([www.genome.arizona.edu/crispr/CRISPRsearch.html](http://www.genome.arizona.edu/crispr/CRISPRsearch.html)) qui permet de concevoir les séquences des sgRNA en fonction des locus et régions prédéfinies. Les travaux de design des séquences et de clonage ont été réalisés par A.C Meunier et M. Helsmoortel. Les sgRNA ont été construits par clonage Golden Gate à l'aide d'un site Bsa I, puis transférés au moyen d'une réaction LR dans le vecteur final pH-Ubi-cas9 (Miao, Guo et al. 2013). Les constructions ont d'abord été transformées en protoplastes au printemps 2014 puis en plante en janvier 2015. Parallèlement à la transformation des sgRNA dirigés contre les gènes *SHR*, nous avons ajouté un contrôle positif de coupure, qui est le sgRNA dirigé contre le gène *CAO1* publié récemment (Miao, Guo et al. 2013). Un contrôle négatif a également été effectué : le vecteur pH-Ubi-cas9 contenant un sgRNA dirigé contre la protéine GUS. Le vecteur vide n'a pas pu être inséré directement car il comporte le système ccdB, propre au clonage Gateway, qui présente des risques de toxicité pour la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*.

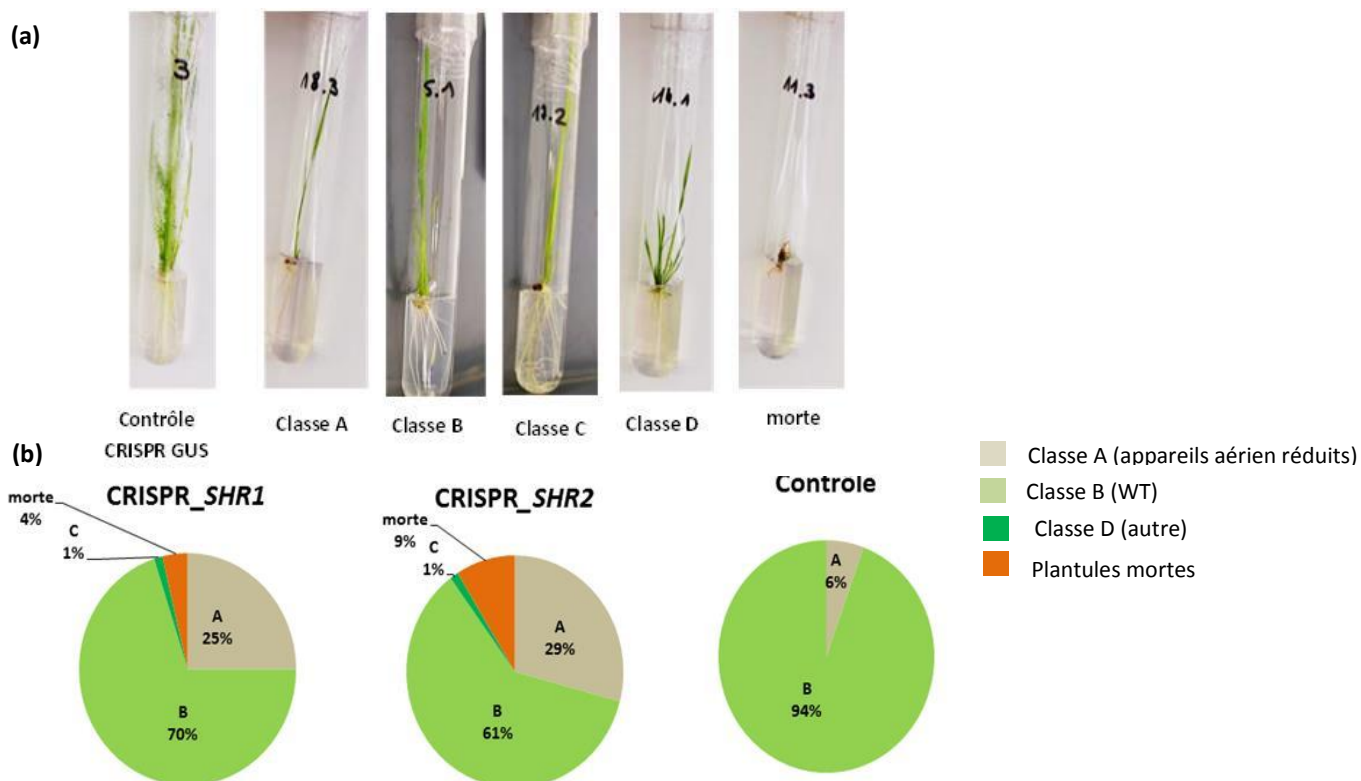
- **Régénération homogène des lignées transgéniques CRISPR/Cas9**

En raison des problèmes de régénération observés pour d'autres construits *SHR* (lignées surexprimeurs, lignées TALEN,...), nous avons suivis de près toutes les étapes de



**Figure 47 : Fréquence de régénération des cals de construits CRISPR/Cas9**

Les contrôles figurent en noir : contrôle négatif avec un CRISPR/Ca9 sans cible dans la plante (GUS) (n=67), et le contrôle positif dirigé contre le gène *Cao1* (Miao, Guo et al. 2013) (n=47) ; les 3 sgRNA dirigés contre *OsSHR1* en gris foncé (n=98, n=17, n=47) et les 2 sgRNA contre *OsSHR2* en gris clair (n=75, n=79).



**Figure 48 : Phénotypage des plantes CRISPR/Cas9 en tube**

(a) Différentes classes phénotypiques des plantes CRISPR SHR en tube comparées aux plantes contrôle CRISPR GUS qui présentent un phénotype WT.

classe A : plante monotalle avec moins de 5 racines ; classe B : plante avec de 2 à 5 talles et un système racinaire réduit ; classe C : plante avec de 2 à 5 talles et un système racinaire normal ; classe D : plante avec un phénotype particulier : exemple ici avec un port des talles en éventail ; plante morte après le passage en tube.

(b) Répartition homogène des plantes selon les 5 classes pour l'ensemble des CRISPR *SHR1* et plantes des lignées CRISPR *SHR2* en comparaison des plantes contrôle CRISPR GUS (crGUS).

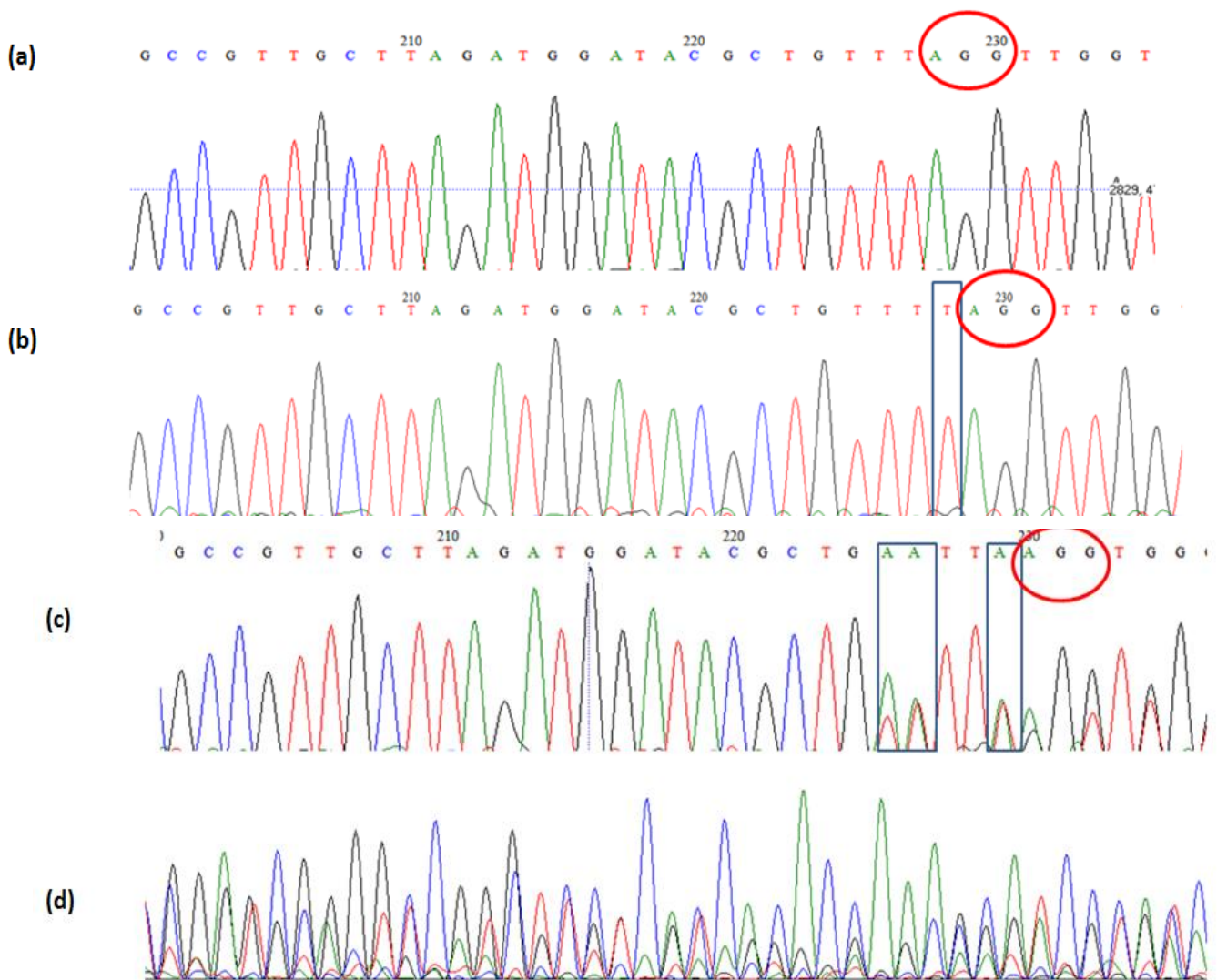
transformation et surtout de régénération. Afin de savoir si les transgènes avaient un impact sur la régénération des cals, nous avons mesuré leur taux de régénération, qui correspond au pourcentage de cals placés sur le milieu de régénération donnant des plantules. Nous avons remarqué que les construits CRISPR\_ *SHR* présentaient un taux de régénération supérieur à 55 % (plus élevé que celui du contrôle), exceptée celui de la lignée CRISPR\_ *SHR1* n°2 qui était inférieur à 20 %, et pour laquelle seulement 4 plantes ont été obtenues (**Figure 47**). Nous avons également remarqué qu'aucun blocage de régénération n'a eu lieu au cours de cette transformation génétique. Le suivi hebdomadaire des cals a mis en évidence une augmentation progressive du verdissement au cours des semaines de régénération (**Annexe 13**). Grâce à ces observations nous pouvons conclure que la présence des transgènes CRISPR dans la plante n'impacte pas/ou peu la régénération des cals ; et que, dans l'hypothèse qu'il y ait des mutants pertes de fonction pour les gènes *SHR1* et *SHR2*, leur suppression n'empêche pas le développement de plantules.

Après 5 semaines sur le milieu de régénération RN, les plantules ont été transférées en tube, période durant laquelle nous avons effectué un phénotypage. Quatre classes ont été établies, ordonnées selon la densité des appareils aériens et racinaires des plantules (**Figure 48 a**). Ce phénotypage a permis de mettre en évidence que la proportion de plantules par classe était homogène d'un CRISPR à l'autre (**Annexe 14**), et que nous pouvions donc comparer l'ensemble des lignées CRISPR *SHR1* à celles des CRISPR *SHR2* (**Figure 48 b**). A ce stade de développement, les plantes CRISPR peuvent être regroupées en deux classes majeures : la classe A (croissances aérienne et racinaire réduites) avec 25 % des plantes pour les CRISPR *SHR1* et 29 % pour les CRISPR *SHR2* et la classe B avec des plantes au phénotype WT (59 % et 53 %).

Ce phénotypage a permis de mettre en évidence que les CRISPR ne semblaient pas avoir d'effet sur la régénération des plantes, et que les phénotypes engendrés sont semblables entre les deux gènes *SHR*, contrairement à ce qui a été observé pour les lignées TALEN. Avant d'être transférées en serre, un prélèvement foliaire sur chacune des plantules a été effectué dans le but de poursuivre les analyses moléculaires, telle que l'identification des mutations au niveau des séquences cibles, et le calcul du nombre de copies du CRISPR dans la plante.

- **Séquençage des lignées CRISPR/Cas9 : identification d'individus KO**

Les analyses de séquençage ont été réalisées avec l'aide de F. Durandet. Afin d'identifier la présence de mutation dans la zone cible des CRISPR/Cas9, nous avons amplifié par PCR la zone d'intérêt et séquencé les amplicons. Sur les 115 plantes étudiées (58 pour les CRISPR\_ *SHR1* & 57 pour les *SHR2*) nous en avons identifié 60% présentant des mutations. L'étude des chromatogrammes de chaque plante a permis de distinguer les individus homozygotes (Ho, 16 %) (**Figure 49 a**), hétérozygotes (He, 50 %) (**Figure 49 b**), non-mutantes (WT, 18 %) (**Figure 49 c**) et chimériques (16 %) (**Figure 49 d**). Ces dernières sont des plantes qui présentent un mélange de cellules mutées (avec plusieurs mutations différentes) et des



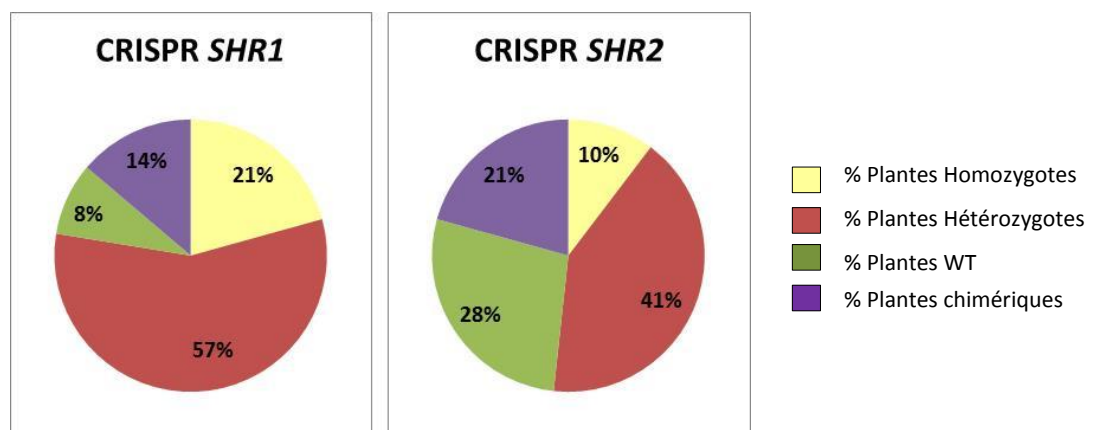
**Figure 49 : Séquençage des CRISPR/Cas9 : identification d'individus WT, Ho, He et chimérique.** Les mutations sont encadrées en noir et le PAM est entouré en rouge.

(a) chromatogramme d'un individu WT

(b) chromatogramme d'un individu Ho avec une insertion d'une Thymine juste avant le PAM.

(c) chromatogramme d'un individu He biallélique avec une insertion sur un brin d'une Thymine juste avant le PAM, et sur l'autre brin de deux Adénine trois bases en amont.

(d) chromatogramme d'un individu chimérique pour lequel plusieurs chromatogrammes se supposent, correspondant à un mix de cellules portant différentes mutations dans la même plante.



**Figure 50 : Répartition des mutations observées dans les lignées CRISPR/Cas9 SHR** (CRISPR SHR1 n= 58 plantes, CRISPR SHR2 n=57 plantes)

cellules non mutées. Sur l'ensemble des plantes hétérozygotes, 90% d'entre elles présentent des hétérozygoties bialléliques, ce qui signifie que les deux brins homologues portent des mutations différentes. Plusieurs types de mutations ont été engendrés par le mécanisme de réparation de l'ADN, telle que des insertions, des délétions et des insertions-délétions. Les plantes homozygotes présentent des insertions ou délétion proches de la zone de coupure de la Cas9, c'est-à-dire 3 nucléotides avant le Protospacer Adjacent Motif (PAM) qui correspond à la zone de reconnaissance/fixation de l'endonuclease Cas9 sur l'ADN. Pour les deux gènes *SHR1* et *SHR2*, la technologie CRISPR a engendré des individus KO indépendants.

Les plantes CRISPR générées présentent un niveau élevé d'hétérozygotie avec 57 % des plantes pour CRISPR\_*SHR1* et 41 % pour les CRISPR\_*SHR2*. Des mutants homozygotes sont retrouvés pour les deux lignées, représentant 21 % de plantes CRISPR\_*SHR1* et 10% des CRISPR\_*SHR2* (**Figure 50**). Les mutations homozygotes sont principalement des insertions d'un nucléotide à proximité des zones de coupure de l'endonuclease, mais un cas de délétion a également été repéré chez les Ho\_CRISPR *SHR2*. En effet, les 12 mutations des Ho\_CRISPR *SHR1* présentent une insertion. Onze d'entre elles sont identiques et localisées dans le PAM du sgRNA n°1, tandis que la 12<sup>ème</sup> se situe plus loin dans la séquence, au niveau du PAM du sgRNA n°3 (**Figure 51 a**). Chez les Ho\_CRISPR *SHR2*, on retrouve 5 insertions proches du PAM et une délétion de 4 nucléotides (**Figure 51 b**). Ces mutations engendrent un décalage dans le cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré. Les protéines générées sont ainsi beaucoup plus courtes que la protéine initiale, avec une séquence peptidique inférieure à 100 acides aminés. Les protéines formées n'ont donc plus de domaine GRAS. On retrouve deux types de protéines générées chez les plantes Ho\_CRISPR *SHR1*, longues de 5 ou 99 acides aminés selon les mutations, comparé à 601 pour la protéine *SHR1* (**Figure 52 a, Annexe 15**). Six protéines sont produites chez les Ho\_CRISPR *SHR2*, dont 5 très courtes (8 acides aminés) une de 99 acide aminés, contre 603 pour *SHR2* (**Figure 52 b, Annexe 15**).

La technique CRISPR/Cas9 a donc permis de produire, dès la première génération, des mutants homozygotes et des KO, pour lesquels nous disposons de plusieurs lignées indépendantes pour chacun des gènes. Cependant, il est important de souligner que ces mutations peuvent être somatiques et il convient de confirmer sur la génération suivante la présence de mutations homozygotes. De plus, il est théoriquement possible que l'endonuclease CAS9 continue à couper l'ADN si elle est toujours capable de reconnaître la séquence cible, si celle-ci est restée intacte. Il est donc possible que des plantes dite WT ou hétérozygote aient un profil différent dans la génération suivante. Dans la suite de cette étude, nous allons restreindre nos analyses aux mutants homozygotes. Des qPCR ont également été effectuées sur ces échantillons afin d'évaluer le nombre de copie du transgène dans la plante. Nous avons donc pu identifier trois individus Ho et WT mono ou bi-copies par gène, qui feront l'objet des analyses plus poussées en génération T1 (analyse de l'anatomie racinaire).



391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520

SHR1 CTTAGATGGATACGCTGTT -AGGTTGGTTAGCCTCCAGCCGCCCTCCGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGTCGGCGTCTACACTCAGGAGCAGCAGCTCAGCGGGTCCAGGTCGTCGTCGACC

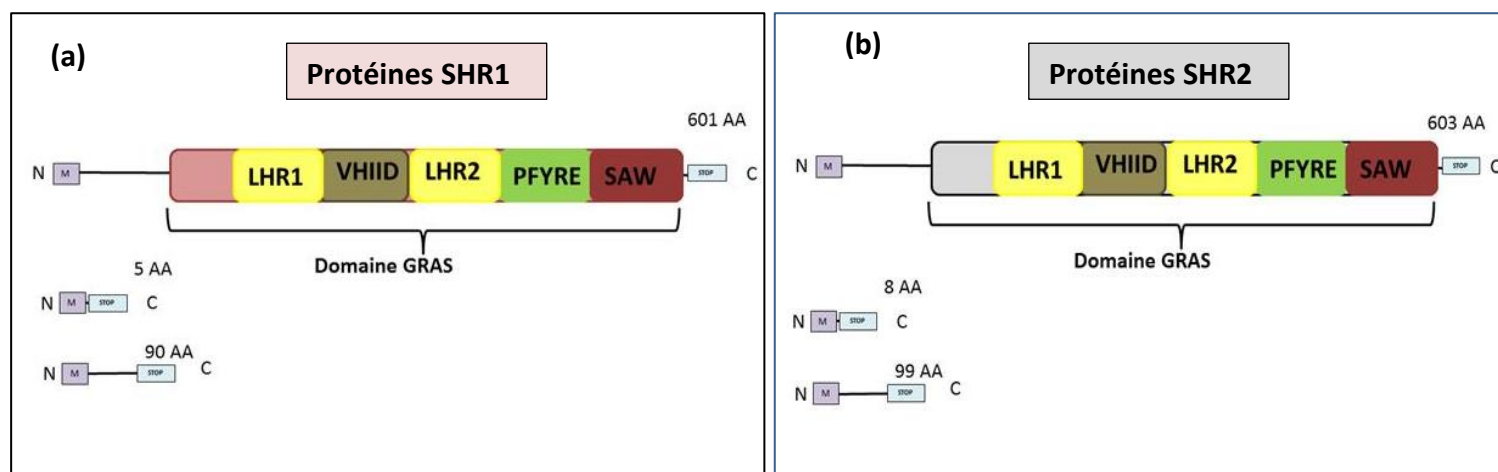
Mut 1 CTTAGATGGATACGCTGTT TAGGTTGGTTAGCCTCCAGCCGCCCTCCGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGTCGGCGTCTACACTCAGGAGCAGCAGCTCAGCGGGTCCAGGTCGTCGTCGACC

Mut 2 CTTAGATGGATACGCTGTT AGGTTGGTTAGCCTCCAGCCGCCCTCCGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGTCGGCGTCTACACTCAGGAGCAGCAGCTCAGCGGGTCCAGGTCGTCGTCGACC

[illegible]

Les alignements des séquences nucléotidiques sont réalisés sur l'interface Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

(b) Les mutant homozygotes des lignées CRISPR\_ *SHR2* sgRNA<sup>n°</sup> 1 et sgRNA n°2 présentent des insertions et une délétion de 4 nucléotides juste avant les séquences de reconnaissance AGG par l'endonucléase (encadrement noir)



(a) Les deux insertions dans la séquence SHR1 provoquent des codons stop (carré bleu) prématurés : 11 mutants présentent une protéine de 5AA de plus que la méthionine (carré violet), et le 12<sup>ème</sup> une protéine de 90 AA.

(b) Quatre insertions différentes provoquent des codons stop prématurés et engendrent des protéines de 8 AA. Un 5<sup>ème</sup> mutant présente une délétion de 4 nucléotides et engendre une protéine de 99 acides aminés, dont la séquence varie beaucoup avec celle de SHR2.

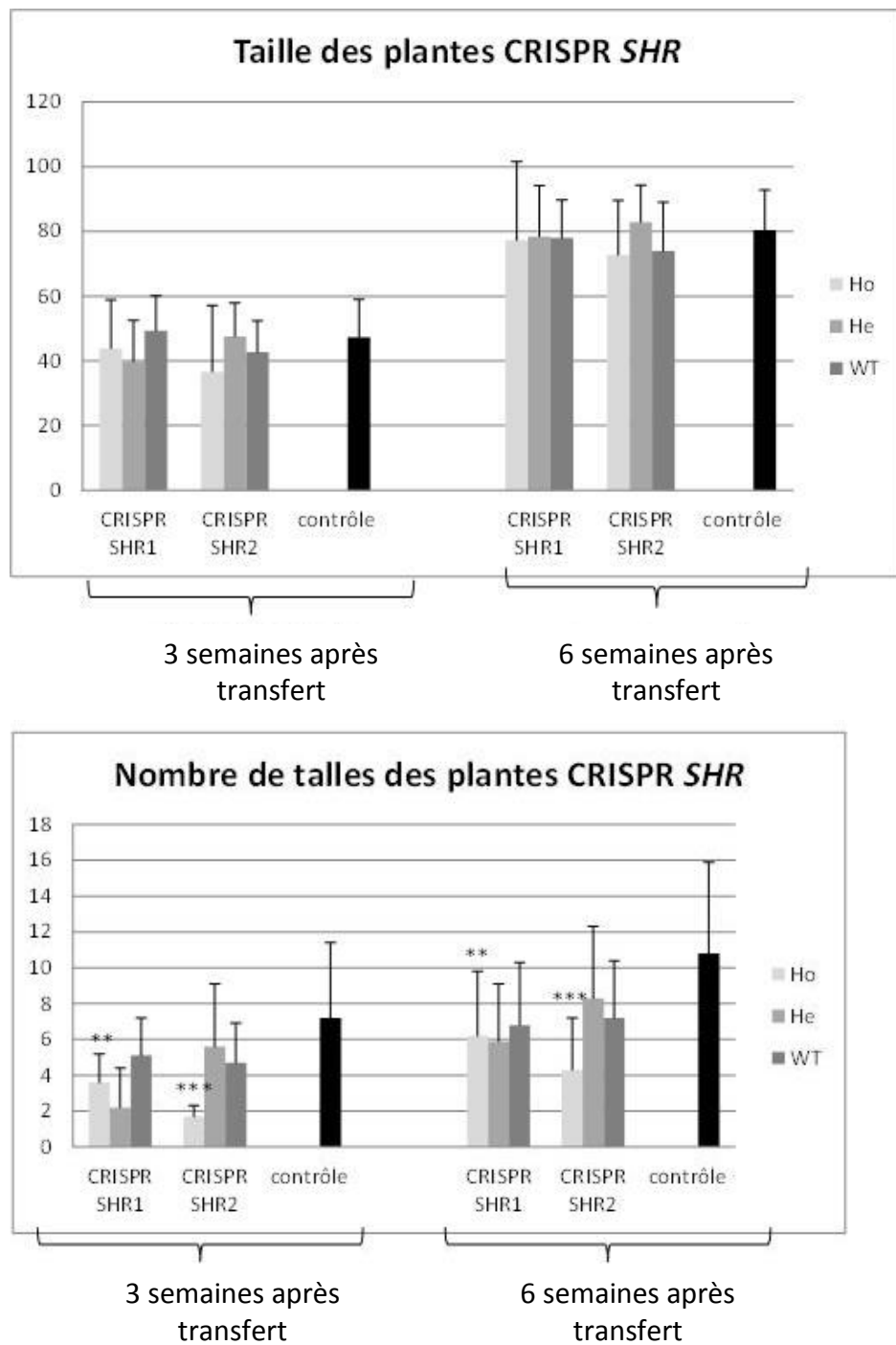
- **Corrélation phénotype-mutation : impact sur le nombre de talles par plante et la fertilité**

Deux phénotypages successifs des plantes en serre ont été réalisés en parallèle des analyses de séquençage. Le premier a été effectué 3 semaines après le transfert en serre (stade tallage) et le second 3 semaines après, juste avant le stade floraison. Toutes les plantes (exceptées les plantes de la lignée CRISPR *SHR1* sgRNA n°2, qui étaient trop peu nombreuses) ont été phénotypées selon des critères basés sur le développement de leur appareil aérien : taille de la plante et son nombre de talles. Aucun critère sur l'anatomie des racines n'a été réalisé à ce stade puisque les plantes sont cultivées en pot et que par conséquent les racines ne sont pas visibles. Nous avons comparé la taille et le nombre de talles des plantes Ho, He et WT pour chacune des lignées CRISPR (2 lignées avec des sgRNA différents par gène), dont les résultats détaillés sont présentés dans les **Annexes 16 & 17**. Les profils des plantes Ho, He et WT étant semblables d'une lignée à l'autre, nous avons représentés les résultats ici en comparant l'ensemble des lignées CRISPR *SHR1* et CRISPR *SHR2* avec la lignée contrôle (**Figure 53**). Aucun impact significatif sur la taille des plantes n'a été observé pour l'ensemble des lignées CRISPR, que ce soit à 3 ou 6 semaines après le passage en serre. De plus, aucune perturbation significative n'a été remarquée sur le système aérien des plantes hétérozygotes, contrairement aux individus homozygotes pour lesquels nous avons remarqué un effet sur le nombre de talles par plante. En effet, 3 semaines après transfert, nous avons remarqué une diminution significative du nombre de talles chez les individus Ho en comparaison de leurs WT et de la lignée contrôle. A 6 semaines après transfert, cette diminution persiste mais n'est visible qu'entre les individus Ho et la lignée contrôle. Il y a donc un amincissement de l'effet développemental « nombre de talles » au cours du temps. Les Ho *SHR1* et *SHR2* se caractérisent par un nombre inférieur de talles, avec un effet plus fort pour la lignée *SHR2* (divisé par 2.5 entre la lignée contrôle et les Ho\_*SHR2*, et par 1.7 chez les Ho\_*SHR1*). Toutefois, il s'agit d'un phénotype assez faible. Aucun effet sur la taille des plantes n'a été observé.

Nous avons également remarqué que sur les 12 individus Ho de la lignée CRISPR *SHR1*, 75% ne donneront pas de descendance en raison d'une mortalité précoce ou de stérilité des individus (33% et 42% respectivement) (**Annexe 18**). Sur les 3 plantes Ho de la lignée CRISPR *SHR2*, l'une d'entre elle est morte, laissant un individu Ho de chaque sgRNA libre de donner une descendance. Pour les deux lignées CRISPR, des individus KO indépendants (avec des mutations différentes) sont donc susceptibles de donner des grains.

Ainsi, nous pouvons conclure que les Ho *SHR1* et *SHR2* se distinguent par un nombre inférieur de talles et par une fertilité réduite, avec 25% des plantes Ho *SHR1* qui sont susceptibles de générer des graines, et 2/3 pour les Ho *SHR2*. La présence d'une protéine tronquée *SHR1* ou *SHR2* semblent engendrer des cas de stérilité mais n'affecte pas toutes les plantes. Il est donc possible de produire des descendants pour ces individus KO homozygotes, de façon analogue à *A.thaliana*, pour laquelle les mutants *shr* n'ont pas de problème de fertilité (Benfey, Linstead et al. 1993).





**Figure 53 : Phénotypage des lignées CRISPR *SHR*.**

Effectifs : CRISPR *SHR1* (Ho n=12, He n=29, WT n=23), CRISPR *SHR2* (Ho n=22, He n=3, WT n=14) et contrôle n=12 (t-test, p-value <0.05%\*\*, p-value <0.01% \*\*\*). Seul le nombre de talles des individus Ho est significativement diminué comparé aux WT respectifs et à la lignée contrôle après 3 semaines et 6 semaines.

- **Conclusion et perspectives**

D'après l'analyse des plantes mutantes en génération T0, nous pouvons conclure que l'absence des protéines SHR dans la plante n'empêche ni la régénération ni le développement de celle-ci. Un nombre diminué de talles est observé mais la taille et la fertilité des plantes ne semblent pas être impactées. De plus, le fait que la régénération ne soit pas ou peu perturbée chez les lignées CRISPR suggère d'abord que ces protéines ne soient pas vitales pour le développement des cals, ou bien qu'il y ait une redondance de leurs fonctions.

Aucune étude de l'anatomie racinaire n'a pu être réalisée à ce jour sur ces plantes. Elle sera en revanche effectuée sur les lignées KO fixées *shr1* & *shr2* de la génération T1. Nous aurons ainsi l'opportunité d'évaluer l'impact de l'absence de ces protéines sur le développement racinaire et son anatomie, et de comparer ces données à celles acquises chez *A.thaliana*. Nous savons en effet que l'absence de SHR chez *A.thaliana* engendre une diminution de la croissance racinaire et la disparition de la couche de cortex (Helariutta, Fukaki et al. 2000).

L'obtention du double mutant *shr1:shr2* permettra de confirmer le rôle essentiel de ces protéines dans la mise en place du cortex et de distinguer les effets spécifiques de chacun des gènes dans le développement racinaire et aérien de celui du double mutant. Celui-ci pourra être obtenu par co-transformation des deux CRISPR\_SHR ou par croisement entre deux individus Ho de chaque lignée KO. La co-transformation servira également à évaluer l'importance des gènes SHR au cours de la régénération, et à confirmer l'hypothèse de la redondance de leurs fonctions au sein de ce processus.



## IV. Conclusion générale : Rôles des gènes *SHR* dans la mise en place du cortex

L'ensemble de nos résultats nous permet de conclure que les gènes *SHR1*, *SHR2* et *AtSHR* ont un rôle identique dans la formation du cortex chez le riz. L'analyse des lignées transgéniques surexprimeurs *SHR* a permis de mettre en évidence la capacité de ces trois gènes à induire des divisions supplémentaires au niveau des cellules initiales du méristème ainsi que des divisions ectopiques dans le tissu mis en place, provoquant ainsi l'apparition de couches surnuméraires de cortex. L'étude menée sur les lignées TILLING a permis de confirmer le rôle de *SHR1* dans la formation de ce tissu, grâce au contrôle qu'il serait susceptible d'exercer sur le diamètre racinaire via des divisions intrinsèques du cortex et de l'endoderme. Ces résultats confirment la théorie selon laquelle il y aurait une conservation de fonctions entre les gènes orthologues (Gabaldon and Koonin 2013), hypothèse déjà avancée par Wu et al. à propos des gènes *SHR* (Wu, Lee et al. 2014).

De plus, la similarité des phénotypes graduels racinaires observés pour les lignées OE *SHR2* et OE *AtSHR*, couplée à l'existence d'une corrélation entre le niveau d'expression de ces gènes et les phénotypes observés, suggèrent que ces deux gènes suivent le mécanisme suivant : plus la concentration en transcrits serait élevée dans la racine de riz, plus les protéines y seraient accumulées et induiraient ainsi des divisions ectopiques débouchant sur la formation de couches surnuméraires de cortex. Cependant, ce mécanisme ne semble pas concerner le gène *SHR1* pour lequel nous avons relevé des différences. D'une part, la surexpression du gène engendre des problèmes de régénération plus forts que ses co-orthologues, avec plus de la moitié des plantes qui ne survivent pas à la transformation génétique, supposant que l'expression ectopique de *SHR1* serait létale pour la plante, et qu'une expression tissu-spécifique ou méristématique pourrait suffire à induire des divisions des initiales et conduire à la formation de couches surnuméraires de cortex. D'autre part, les phénotypes de la lignée *pSHR1:SHR1:GFP* diffèrent de ceux observés pour le même construit avec *SHR2*. En effet, l'analyse des fusions traductionnelles a révélé des différences phénotypiques, avec 70% des plantes de la lignée *SHR2:GFP* qui présentent un enroulement des feuilles contre seulement 25 % et 0 % des fusions traductionnelles de *SHR1* et *AtSHR*. Ce résultat pourrait être expliqué par une mobilité plus importante de *SHR2* que ses co-orthologues, et confirmerait alors les résultats obtenus chez *A.thaliana* par nos collaborateurs (Wu, Lee et al. 2014). *SHR1* et *SHR2* auraient donc tous les deux un rôle dans la mise en place du cortex, mais fonctionneraient indépendamment (pas de régulation croisée) et selon des mécanismes différents. En revanche, la récente obtention de mutants KO *shr1* et *shr2* suggèrent que d'une part que l'absence des protéines SHR n'empêcherait ni la régénération ni le développement de la plante, et que d'autre part, ces gènes pourraient avoir des fonctions redondantes pendant la régénération.

L'ensemble de nos résultats suggère donc que les trois gènes SHR ont un rôle commun dans la mise en place du cortex via des mécanismes moléculaires distincts, et qu'ils pourraient aussi présenter des fonctions redondantes pendant la régénération. Ce dernier



point sera éclairci dans le chapitre suivant, qui porte sur le rôle des gènes SHR dans la callogénèse.

Finalement, seule l'étude des KO complétée par une analyse transcriptomique des trois lignées KO, WT et OE pour chaque gène permettra d'identifier les mécanismes moléculaires propres à chacun des gènes et de distinguer les fonctions des gènes *SHR1* et *SHR2* dans la mise en place du cortex, le contrôle des divisions et la régénération.

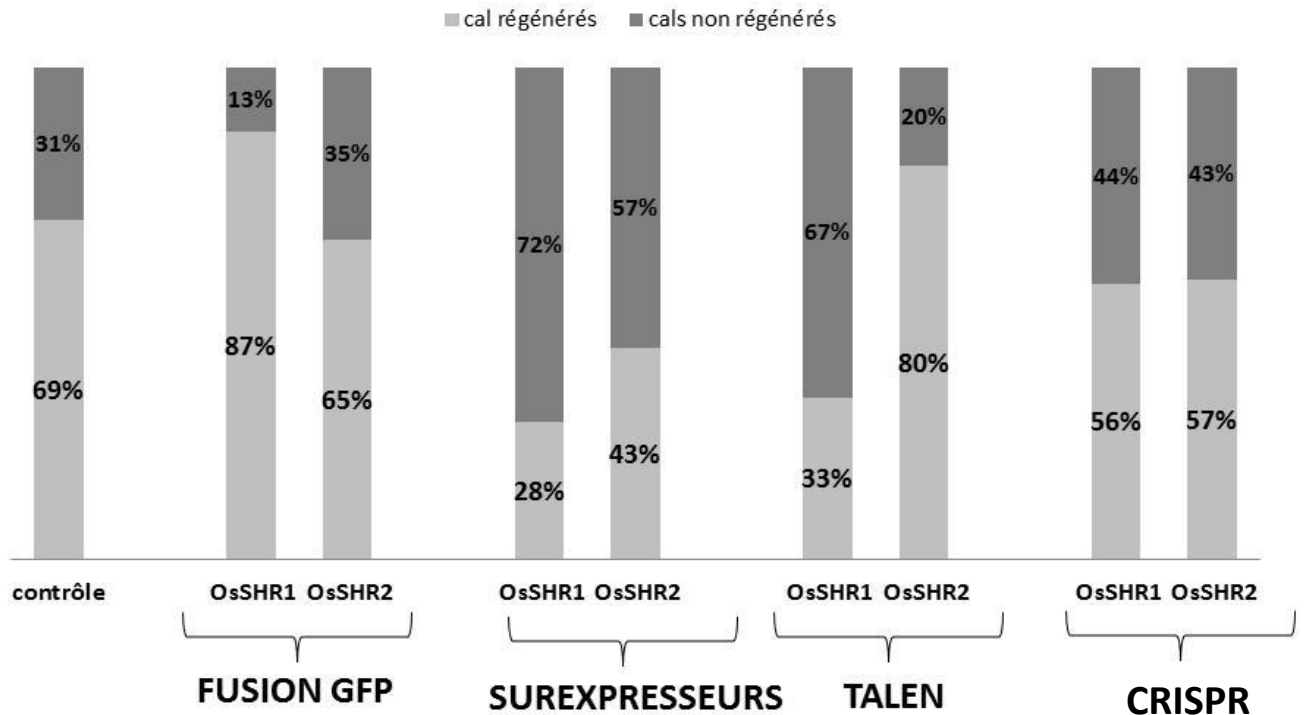




## **CHAPITRE III**

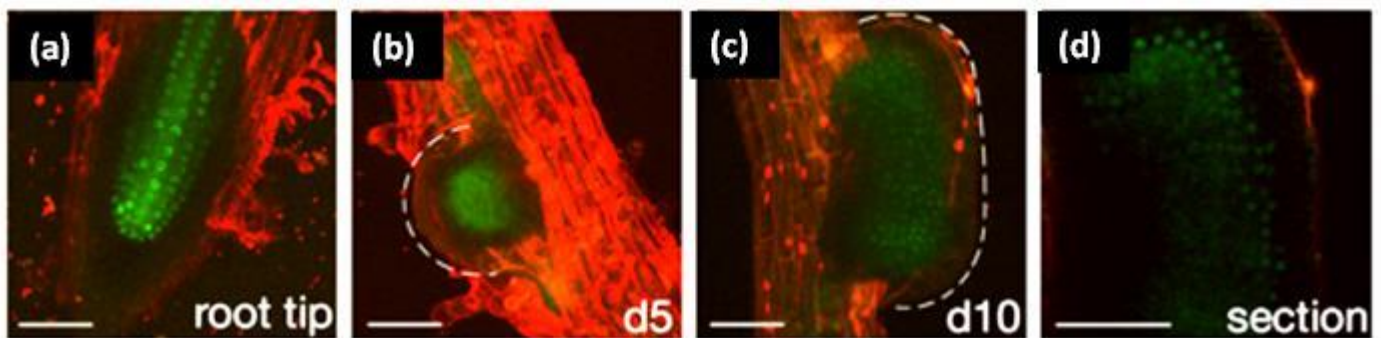
# **Etude de l'expression d'*OsSHR1* dans le développement du cal et de la plante**

## Taux de régénération des lignées transgéniques *SHR*



**Figure 1 : comparaison des taux de régénération des différents construits *SHR***

Le contrôle est une moyenne de la régénération des lignées contrôle pour les 4 transformations. (Effectifs: Contrôles n=1097; *SHR1*:GFP n=118, *SHR2*:GFP n=109 ; OE *SHR1* n=627, OE *SHR2* n=761; TALEN *SHR1* n= 26, TALEN *SHR2* n= 96; CRISPR *SHR1* n=145, CRISPR *SHR2* n=154)



**Figure 2 : Comparaison du profil d'expression d'AtSHR entre un LRP et un cal (milieu d'induction CIM) (Sugimoto, Jiao et al. 2010). Barres=50μm**

Les échantillons sont marqués au PI pour mettre en évidence les contours cellulaires, et la protéine est mise en évidence par une fusion GFP. Les pointillés mettent en évidence la zone de formation du cal.

Les images sont obtenues par imagerie confocale.

(a) Localisation de la protéine dans un LRP au niveau de la stèle.

(b) Localisation centrale de la protéine dans un cal de 5 jours.

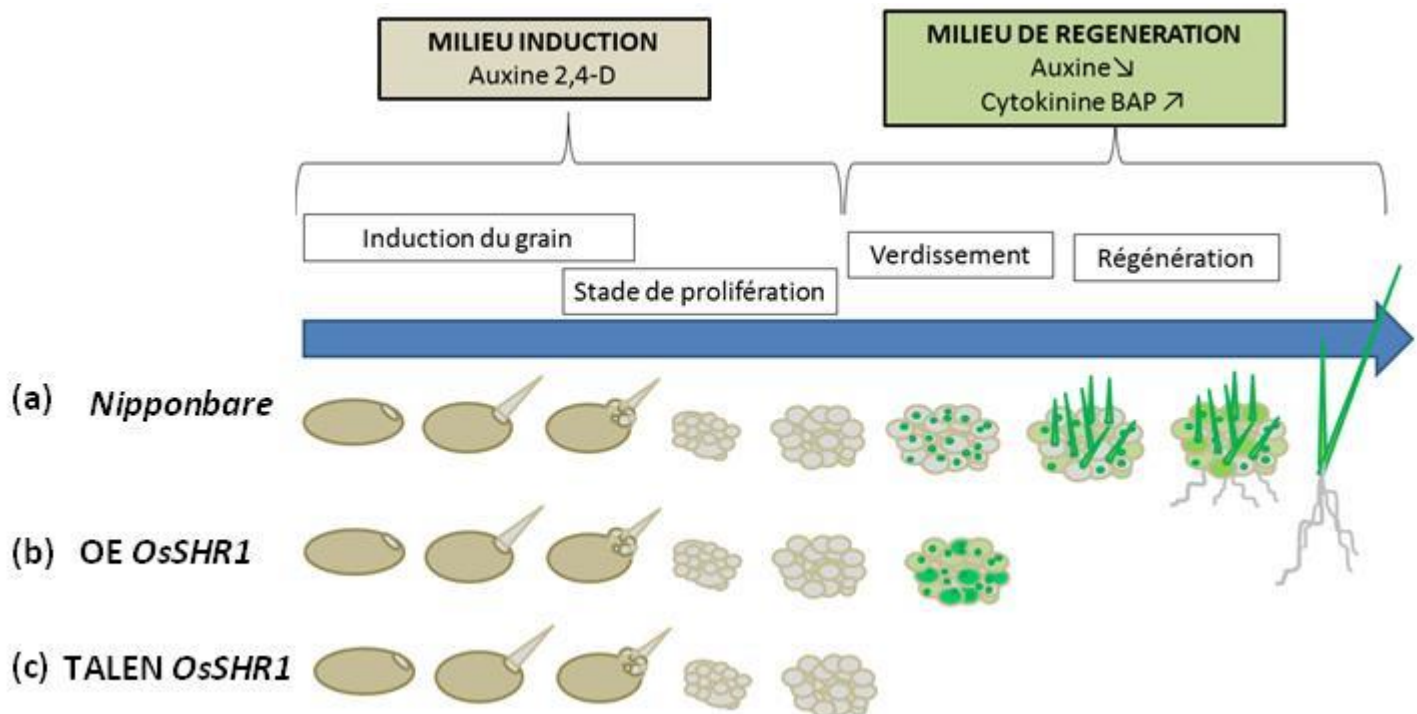
(c) Localisation centrale de la protéine dans un cal de 10 jours.

(d) Section optique d'un cal de 10 jours, avec une localisation centrale de la protéine SHR.

## Introduction

Lors de l'étude fonctionnelle des gènes *SHR*, nous avons été amenés à générer des lignées transgéniques modifiant leurs niveaux d'expression et pour lesquelles nous avons observé de nombreux problèmes de régénération. Exceptées les fusions traductionnelles qui modifient peu le niveau d'expression du gène dans la plante, les construits surexprimeurs, TALEN et CRISPR/Cas9 ont montré des taux de régénération plus faibles qu'attendus (**Figure 1**). Ce constat est d'autant plus vrai pour le gène *OsSHR1*, qui présente des taux de régénération plus faibles que pour son co-orthologue *OsSHR2*. Cela amène à l'hypothèse suivante selon laquelle *OsSHR1* seul jouerait un rôle important lors de la régénération.

Aucun travail ou article concernant *AtSHR* ne fait mention de difficultés de régénération des lignées surexprimeurs ou pertes de fonction chez *Arabidopsis thaliana*. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le protocole de transformation utilisé pour générer des plantes transgéniques ne fait pas appel à la culture *in vitro*. En effet, les transformations génétiques par *Agrobacterium tumefaciens* se font depuis la fin des années 90 par immersion florale (floral dip) (Clough and Bent 1998). La callogénèse a été néanmoins beaucoup utilisée avant la technique du « floral dip », et des protocoles standardisés ont été mis en point. Ces derniers ont permis de mieux étudier ce processus et d'identifier les mécanismes moléculaires permettant aux cellules d'acquérir leur pluripotence et la capacité à régénérer des plantes. Des études ont été menées sur l'identification des gènes impliqués lors des différentes étapes de callogénèse, et l'une d'entre elles a démontré que les cals avaient la même signature moléculaire que des primordia de racines latérales (Lateral Root Primorium, LRP) (Atta, Laurens et al. 2009) et que, par conséquent, les gènes impliqués dans la mise en place de ces LRP interviennent également dans la callogénèse. En effet, le gène *Alf-4* qui est nécessaire à la formation de racines latérales chez *A. thaliana* (Celenza, Grisafi et al. 1995) est également indispensable à la callogénèse (Sugimoto, Jiao et al. 2010) et aux premières divisions de protoplastes isolés (Chupeau, Granier et al. 2013). Le gène *AtSHR* présente une expression précoce dans le développement du cal (Sugimoto, Jiao et al. 2010) et la protéine SHR aurait une localisation similaire à celle observée dans les racines, à savoir une localisation cytosolique dans la partie centrale du cal et nucléaire dans la zone sous-épidermale (Sugimoto, Jiao et al. 2010) (**Figure 2**). D'autres gènes impliqués dans le processus de régénération ont été récemment identifiés, tels que les gènes PLETHORA (*PLT*) qui sont aussi nécessaires à la formation des LRP. En effet le triple mutant *plt3;plt5;plt7* dispose d'un appareil aérien normal, mais il est incapable de produire des racines latérales. Une étude portant sur l'analyse de ce mutant au cours de la callogénèse (Kareem, Durgaprasad et al. 2015) a mis en évidence que l'étape de régénération des cals était induite par une forte diminution de l'expression de gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence. Cette diminution serait induite par le changement de balance hormonale qui a lieu lors du transfert des cals sur le milieu de régénération. Il existe en effet deux milieux de



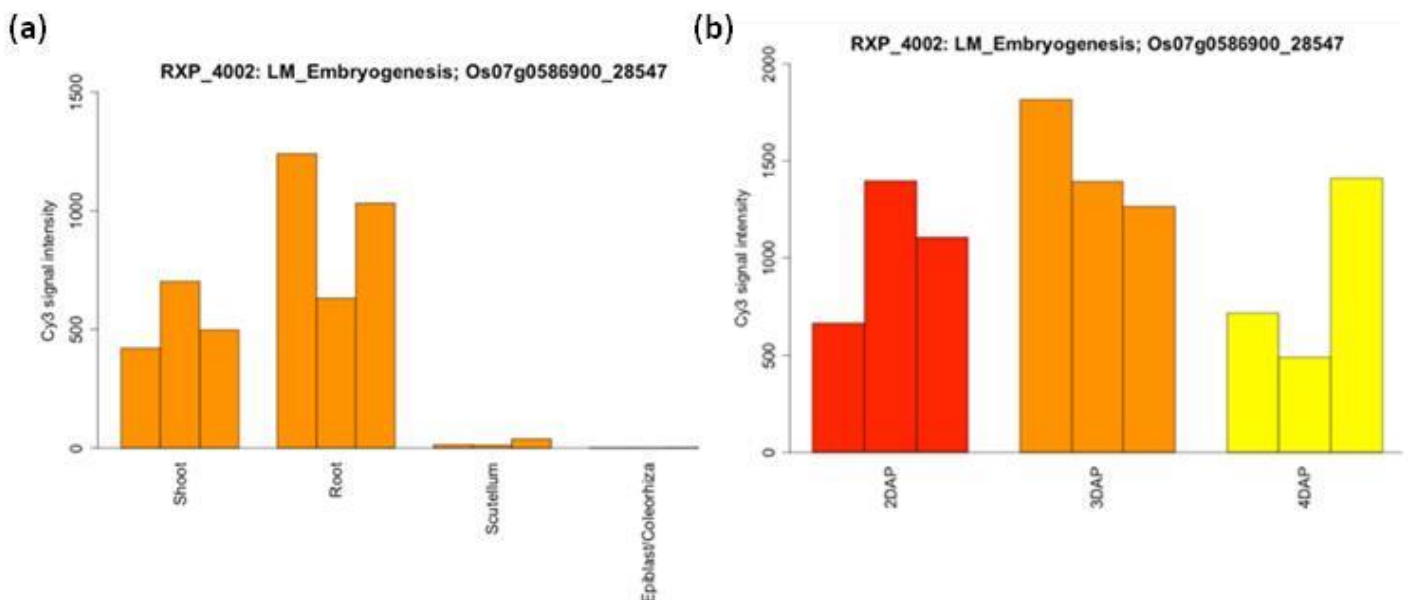
**Figure 3 : Schéma du processus de régénération du riz**

(a) Après induction du cal sur un milieu riche en auxine (2,4-D), les cals sont transférés sur un milieu riche en cytokinines (BAP) et se mettent à verdifier et à générer des organes (tiges puis racines).

Pour les lignées transgéniques la régénération est perturbée.

(b) La lignée *OE SHR1* ne régénère pas et stoppe le développement des cals au stade de verdissement.

(c) La lignée *TALEN SHR1* ne régénère pas et se stoppe durant l'étape de prolifération, avant le stade de verdissement.



**Figure 4 : Profil d'expression d'*OsSHR1* d'après les données transcriptomiques du site RiceXPro.** [http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/RXP\\_4002/gene-search.php](http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/RXP_4002/gene-search.php)

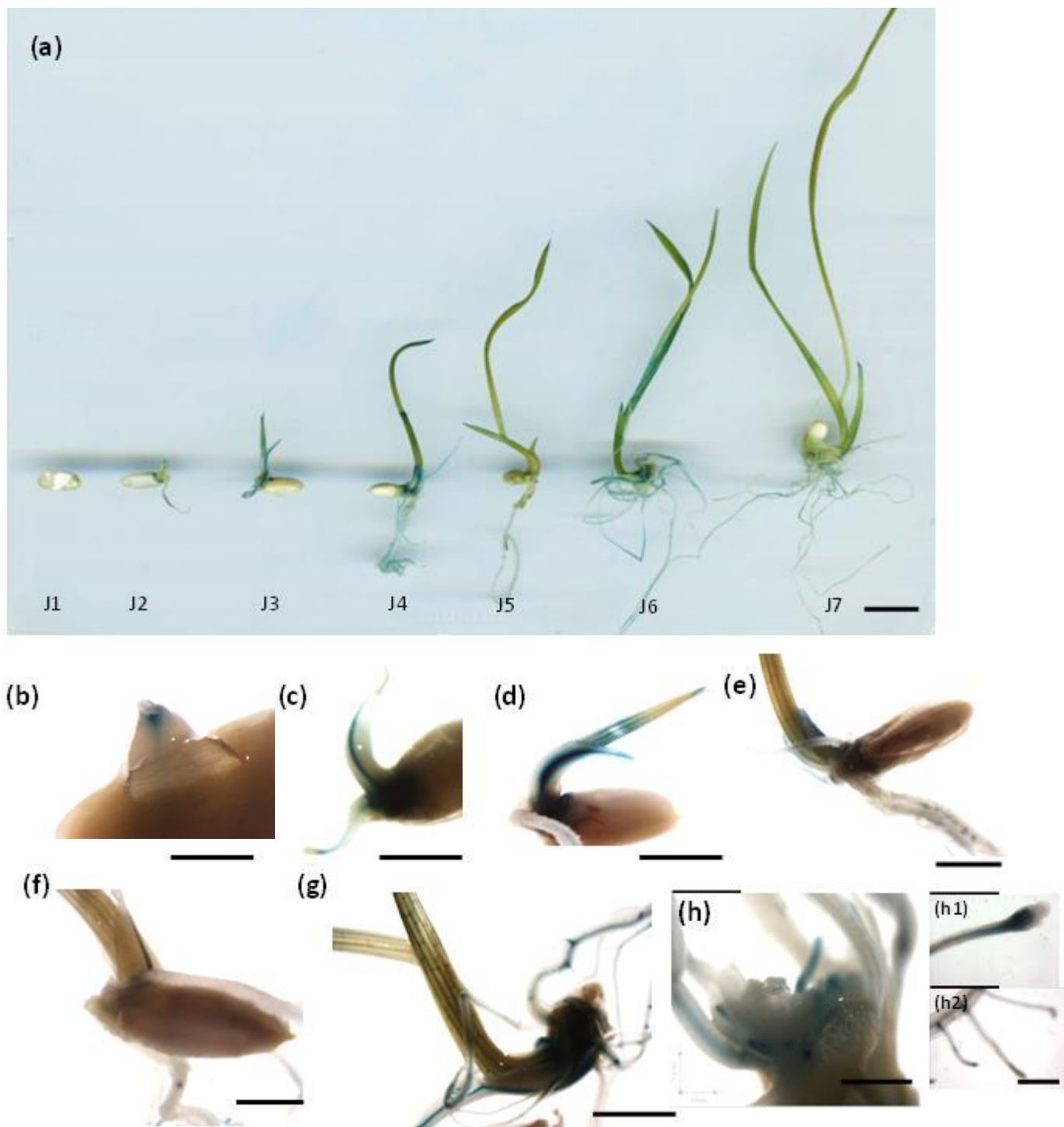
(a) Profils d'expression du gène dans les différentes parties de la plante : tige, racine, scutellum (cotylédon) et épiblaste (couche cellulaire de revêtement de l'embryon) (n=3).

(b) Intensité de l'expression sur les 4 jours suivant la pollinisation (DAP), (n=3)

culture *in vitro*: le premier milieu dit « d'induction » (Callus Induction Media, CIM) est un milieu riche en auxine, qui permet la prolifération des cellules et leur maintien en pluripotence. Une fois les cals bien développés, ils sont transférés sur le second milieu dit de « régénération » (Shoot Induction Media, SIM) riche en cytokinines, qui permet la régénération de cals en plantes (**Figure 3 a**). Le triple mutant *plt3;plt5;plt7* présente un blocage lors de l'étape de régénération. Cette « non-régénération » serait expliquée d'une part par l'absence d'induction des gènes régulateurs de cellules souches (les gènes *PLT1&2*) dans le cal, signifiant l'absence du maintien de la pluripotence ; et d'autre part par l'absence d'activation des gènes de régénération.

Ces résultats nous ont permis d'émettre des hypothèses quant aux problèmes de régénération observés chez les lignées transgéniques *SHR* chez le riz. Que ce soit chez les lignées surexprimeurs ou les lignées TALEN, la régénération des cals *OsSHR1* a été grandement perturbée, mais à des stades différents. En effet chez les surexprimeurs les cals sont bloqués au stade « verdissement » (**Figure 3 b**), qui correspond au stade où la différenciation des embryons somatiques est induite par la modification de la balance hormonale. La concentration en cytokinines est augmentée et celle d'auxine est diminuée, induisant la différenciation des embryons somatiques. Les cals TALEN, eux, n'arrivent pas à ce stade et semblent être bloqués au cours de la callogénèse (**Figure 3 c**). Le blocage des cals TALEN semble similaire à celui observé pour le triple mutant *plt3;5;7 d'A.thaliana*, où aucune différenciation des cals ne semble avoir lieu. Ce constat suggère que les gènes *SHR* auraient pour rôle de maintenir les cellules à l'état indifférencié dans le cal, à l'instar des gènes *PLT1&2* dans l'étude de Kareem et al. Cette hypothèse est d'autant plus séduisante que les gènes *PLT1* et *PLT2* ont pour rôle de maintenir les initiales à l'état de cellules souches dans le méristème racinaire d'*A.thaliana*, tout comme le gène *SHR* (Zhang and Yu 2014; Jia, Tian et al. 2015).

Pour tenter d'apporter une première réponse à cette hypothèse, nous avons décidé d'étudier le rôle des gènes *SHR* au cours de la callogénèse chez le riz. Nous avons dans un premier temps suivi l'expression d'*OsSHR1* au cours du développement de la plante (de l'embryon au stade plante), avant de s'intéresser à son expression dans le cal grâce à une lignée transgénique contenant le promoteur *SHR1* fusionné à la protéine GUS.



**Figure 5 : Profil d'expression de la fusion *pOsSHR1:GUS* pendant 7 jours après germination**

(a) Profils d'expression du gène dans les différentes parties de la plante durant les 7 jours suivant la germination. Barre=1cm

(b) Zoom sur le profil d'expression d'*OsSHR1* au premier jour de germination. Le gène est exprimé dans le coléoptile, au niveau des faisceaux vasculaires. Barre= 0.2cm

(c) Zoom sur le profil d'expression d'*OsSHR1* 2 jours après germination. Le gène est exprimé au niveau des faisceaux vasculaires du coléoptile et de la racine séminale. Barre= 0.4cm

(d) Zoom sur le profil d'expression d'*OsSHR1* 3 jours après germination. Le gène est exprimé au niveau des faisceaux vasculaires du coléoptile, de la feuille et de la racine séminale. Barre= 0.5cm

(e) Zoom sur le profil d'expression d'*OsSHR1* 4 jours après germination. Le gène est exprimé au niveau des faisceaux vasculaires de la feuille et des racines. Barre= 0.4cm.

## I. Etude de l'expression d'*OsSHR1* au cours du développement de la plante

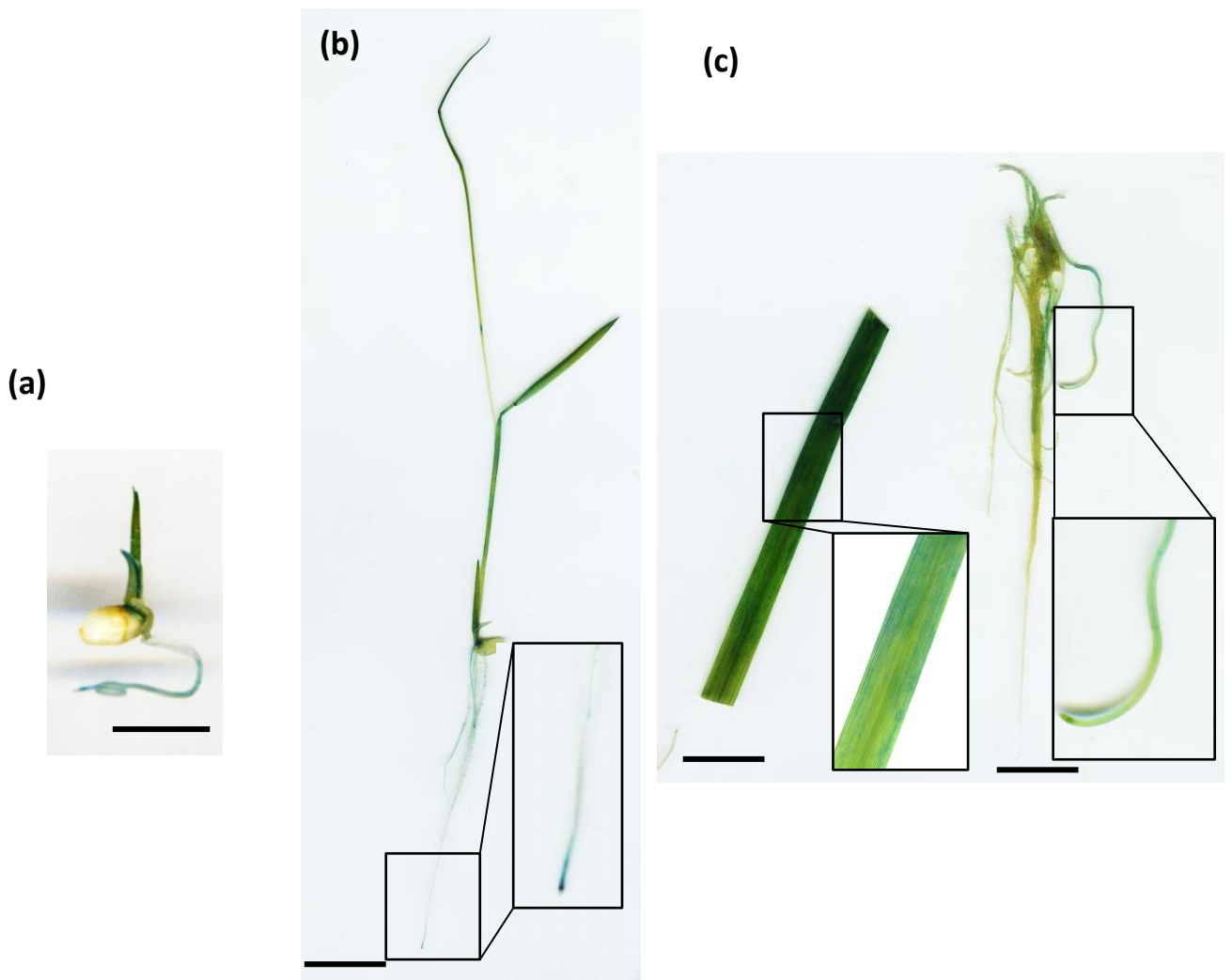
Avant de se focaliser sur l'expression d'*OsSHR1* durant la callogénèse, nous avons voulu étudier son expression dans l'embryon mature, stade initial du développement, et savoir également si son expression était stable dans le temps.

L'embryon de riz est caractérisé par une structure bipolaire munie de deux méristèmes : le méristème caulinaire et le méristème racinaire, qui, suite au processus de germination, donnent naissance à une nouvelle plante. La callogénèse précède ce stade puisqu'elle consiste, à partir de cellules indifférenciées, à générer cet embryon. Nous nous sommes donc intéressés à l'expression d'*OsSHR1* au cours des premières étapes du développement de la plante.

### I.1 *OsSHR1* est exprimé dès la germination

Les données disponibles sur le site RiceXPro, rassemblant de nombreux profils d'expression de gènes à différents stades et dans différents organes (<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>), démontrent que le gène *OsSHR1* est présent très tôt dans le développement de la plante, dès l'embryogénèse. En effet, on voit apparaître un signal dans le scutellum (**Figure 4 a**). Même si le niveau d'expression est plus faible que dans les organes après germination (racines et tige), *OsSHR1* est exprimé à un stade précoce du développement. Son expression est mise en évidence durant l'embryogénèse et dans les jours suivant la pollinisation (**Figure 4 b**). Nous avons réalisé des tests GUS quotidiens durant une semaine sur des grains en germination (**Figure 5 a**). *OsSHR1* est exprimé très tôt au cours du développement : la coloration GUS est visible dans l'embryon et persiste après la germination. Il est d'abord présent au niveau du coléoptile (**Figure 5 b**), qui est un organe transitoire spécifique des monocotylédones et dont le rôle est de protéger les futures pousses, puis au deuxième jour de germination il apparaît dans la racine séminale, où le gène est localisé au niveau des faisceaux vasculaires (**Figure 5 c**). Au troisième jour le signal persiste dans les feuilles et la racine séminale, et apparaît au niveau de la stèle des racines coronaires (**Figure 5 d**). Jusqu'à sept jours après la germination, le profil d'*OsSHR1* est localisé au niveau des faisceaux vasculaires : au niveau de la stèle des racines, les primordia des racines latérales et les nervures des feuilles (**Figure 5 e à h**). Ces résultats confirment ceux présentés par le site RiceXPro, et nous permettent de conclure que le gène *OsSHR1* a une expression précoce et stable dans la plantule. Lorsqu'on compare le profil d'*OsSHR1* pendant la germination à celui d'une plantule âgée de 10 jours ou celui d'une plante mature, on remarque que sa localisation est toujours limitée aux faisceaux vasculaires et que l'intensité de son expression ne semble pas varier (**Figure 6**).





**Figure 6 : Comparaison des profils d'expression du transcrit *OsSHR1* de la germination à la plante mature.**

(a) Profils d'expression du gène 3 jours après germination. Barre=1cm

(b) Profils d'expression du gène 10 jours après germination, avec zoom sur la coloration GUS dans la pointe de la racine séminale. Barre=1,5 cm

(c) Profils d'expression du gène dans une plante mature âgée d'un mois, avec zoom sur la coloration GUS dans les nervures de la feuille, et sur la pointe d'une racine coronaire. Barre=1 cm

## I.2 Profil d'expression d'*OsSHR1* en réponse à différents signaux environnementaux

- **Régulation hormonale**

Ni l'intensité de son expression ni sa localisation ne varient au cours du développement. Nous avons voulu savoir si ces paramètres variaient en présence d'une ou plusieurs hormones. Nous avons donc analysé les profils d'expression du gène dans des plantules placées sur des milieux contenant diverses hormones végétales : l'auxine (IAA), l'acide naphthylphthalamique (NPA), qui est un inhibiteur de transport de l'auxine; les gibbérellines (GA3) et le paclobutrazol (PA), qui est un inhibiteur de la synthèse des GA.

Le profil d'expression d'*OsSHR1* est stable quel que soit l'hormone ou l'inhibiteur de synthèse présent dans le milieu. La croissance de la plante est affectée, avec une augmentation de la vitesse de croissance sur les milieux riches en IAA et GA, et une diminution sur PA et NPA, mais cela n'impacte pas le profil d'expression de *SHR1* (**Figure 7 a et b**). Le niveau d'expression a également été étudié par qRT-PCR (**Figure 7 c**). Le niveau d'expression d'*OsSHR1* varie en fonction des organes ciblés (signal plus fort dans les racines que dans les feuilles ou la tige), mais en revanche l'ajout d'hormones ou d'inhibiteurs de leurs biosynthèses n'affectent pas son niveau d'expression. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus au cours de l'analyse transcriptomique sur puce ADN disponibles sur le site RiceXPro (**Figure 8**).

- **Régulation d'*OsSHR1* par la lumière**

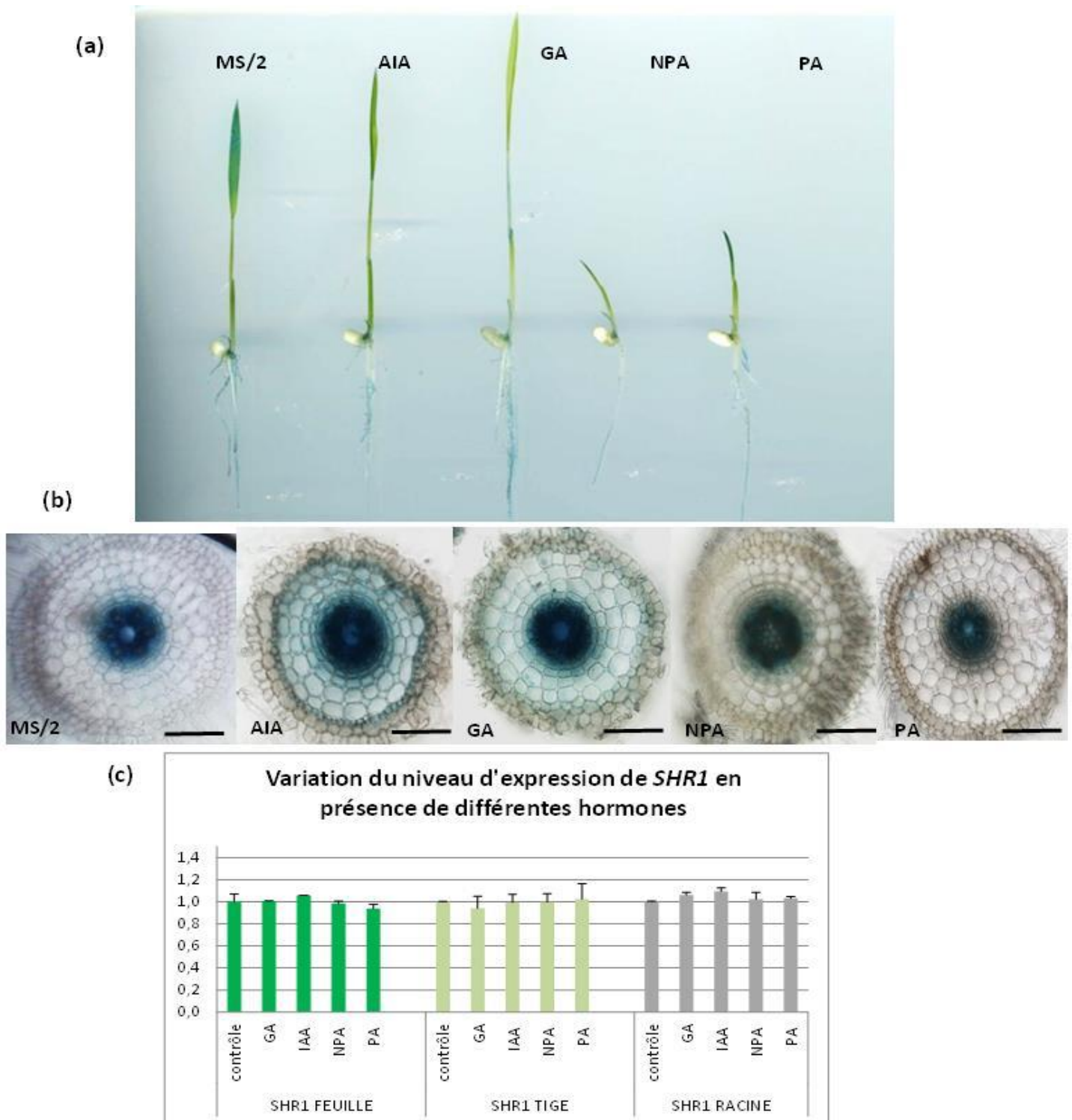
Nous avons voulu savoir si l'expression d'*OsSHR1* dépendait de la lumière. Pour cela nous avons analysé le profil d'expression du gène par coloration GUS et son niveau d'expression par qRT-PCR dans les deux conditions lumière et obscurité. Aucun différentiel n'a été observé (**Figure 9**). L'expression d'*OsSHR1* semble indépendante de la lumière.

- **Régulation abiotique**

Nous avons également analysé les profils d'expression sur des milieux simulant un stress abiotique: nous avons analysé le signal GUS des plantules transgéniques *pOsSHR1*:GUS sur du milieu MS/2 en présence de mannitol et de NaCl. La croissance de la plante est affectée pour les deux conditions lorsqu'on compare à la condition contrôle (MS/2), mais le profil d'expression d'*OsSHR1* ne varie pas (**Figure 10**).

## I.3 Conclusion : *OsSHR1* a une expression stable au cours du temps

Le gène *OsSHR1* a un profil d'expression stable au cours du développement de la plante, de l'embryon jusqu'au stade mature. Son expression ne semble régulée ni par les hormones, ni par la lumière et ni par des stress salin ou osmotique. Néanmoins, il est possible que son activité soit contrôlée au niveau post-transcriptionnel.



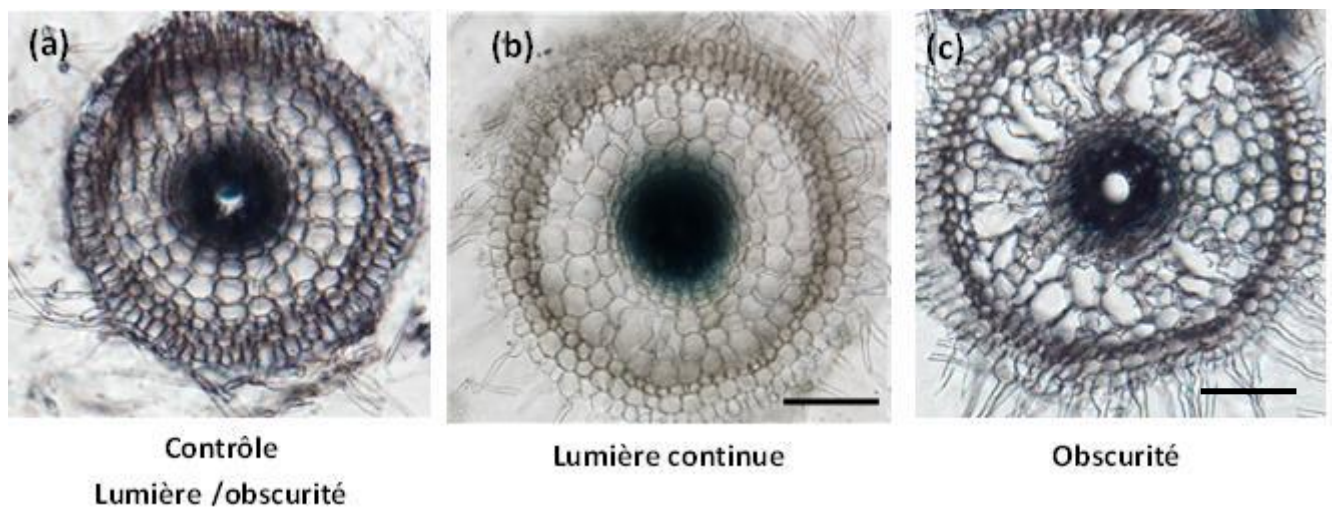
**Figure 7 : Le profil d'expression d'*OsSHR1* ne varie pas en présence d'auxine, de gibbérélines, de NPA ou PA.**

(a) Le profil d'expression est révélé par une coloration GUS. Il est en similaire entre les différents milieux : milieu de croissance classique MS/2, milieu enrichi en auxine (AIA : 1  $\mu$ M) milieu enrichi en GA (50 $\mu$ M), milieu enrichi en NPA (1 $\mu$ M) et milieu enrichi en PA (2  $\mu$ M).

(b) Coupes radiales de racines coronaires pour chacune des conditions (contrôle MS/2, AIA, GA, NPA et PA), avec un signal localisé dans la stèle pour chacune d'entre elles. Barres= 50 $\mu$ m. (c) Niveau d'expression du gène *OsSHR1* ne semble pas être impacté par la présence d'hormone (GA, AIA, PA ou NPA) (n=2)



**Figure 8 : Expression du gène *OsSHR1* selon la concentration en hormone présente dans le milieu** ([http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/RXP\\_4002/gene-search.php](http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/RXP_4002/gene-search.php)).

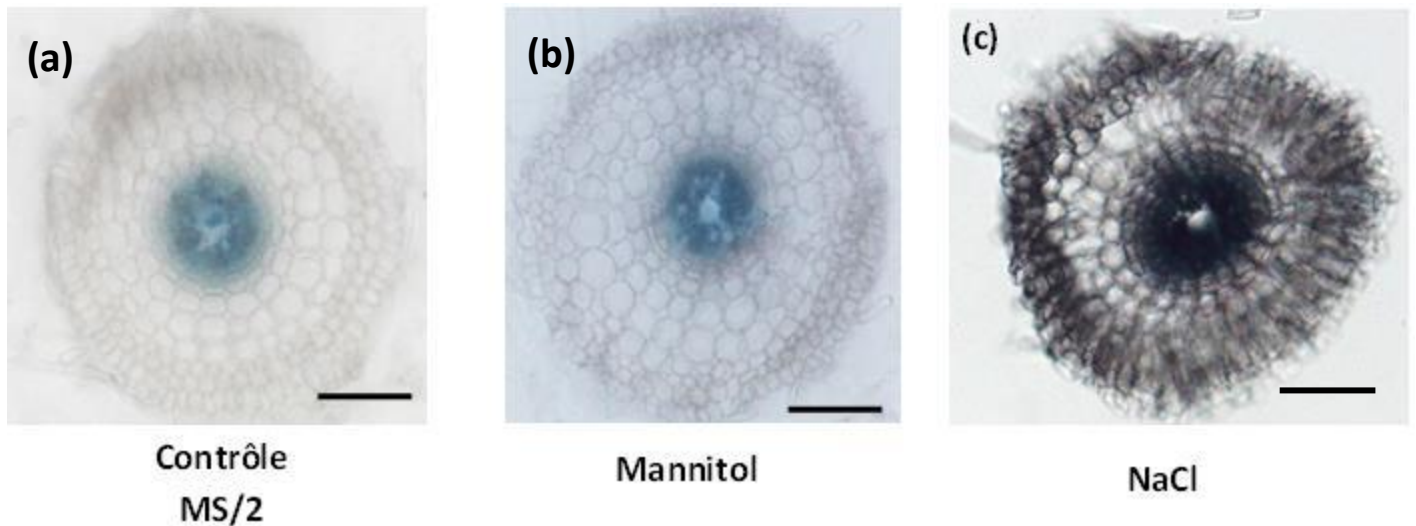


**Figure 9 : Profils d'expression d'*OsSHR1* selon la photopériode.** Barres=50µm

(a) Coloration GUS d'une coupe radiale de racine *pOsSHR1*:GUS en condition contrôle, avec alternance lumière et obscurité (12h/12h, 28°C/25°C jour/nuit, intensité lumineuse : 500µEm-2s-1, humidité relative 55%).

(b) Coloration GUS d'une coupe radiale de racine *pOsSHR1*:GUS sous lumière continue (28°C/25°C jour/nuit, intensité lumineuse : 500µEm-2s-1, humidité relative 55%).

(c) Coloration GUS d'une coupe radiale de racine *pOsSHR1*:GUS dans l'obscurité (28°C/25°C jour/nuit, humidité relative 55%).



**Figure 10 : Profils d'expression d'*OsSHR1* en réponse au mannitol et NaCl.**

Comparaison entre des plantules sauvages de la variété *Nipponbare* et deux lignées transgéniques indépendante pour le construit *pOsSHR1*:GUS en réponse au mannitol (90 mM) et NaCl (90 mM). Barres= 50µm

(a) Coupe radiale de racine coronaire sur condition standard (MS/2), avec un signal GUS spécifique à la stèle.

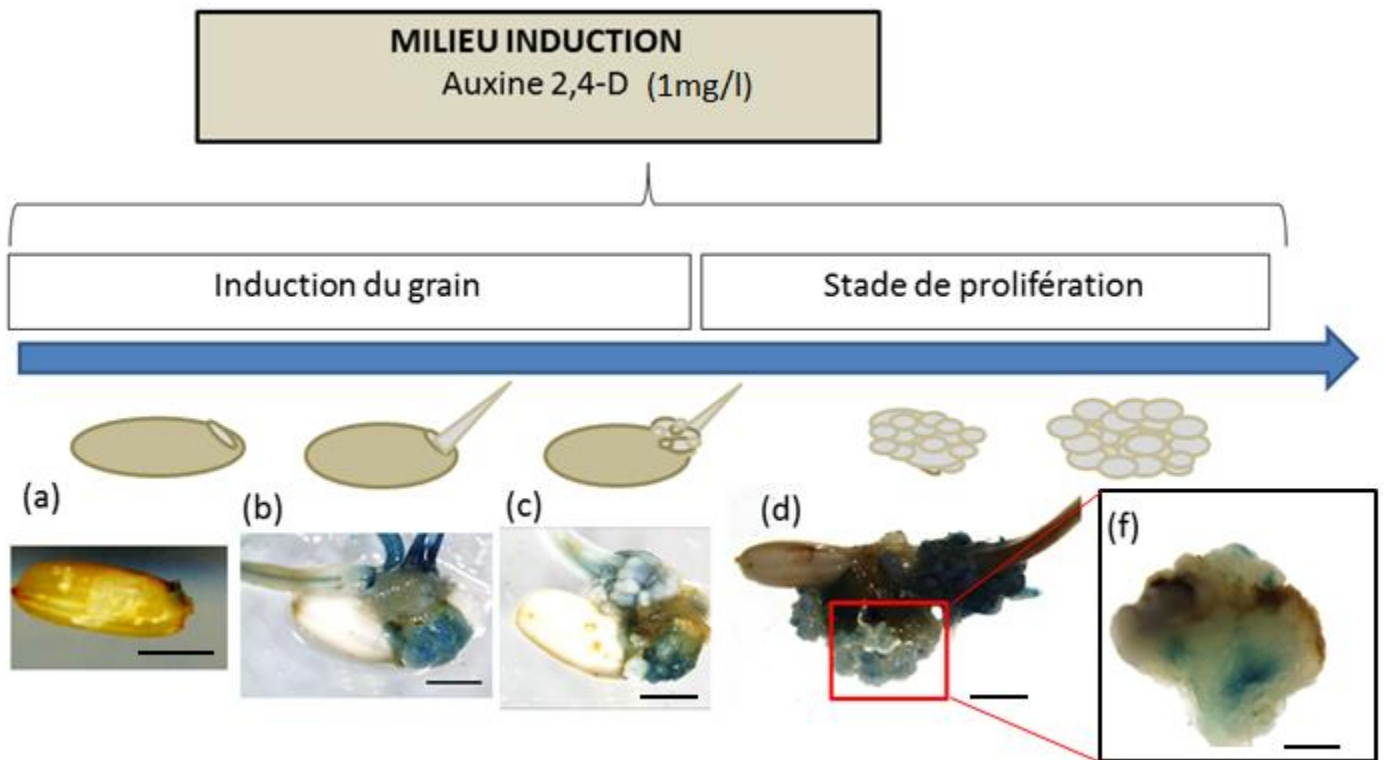
(d) Coupe radiale de racine coronaire sur Mannitol, avec un signal GUS spécifique à la stèle.

(e) Coupe radiale de racine coronaire sur NaCl, avec un signal GUS spécifique à la stèle.

Un contrôle post-transcriptionnel a été démontré pour *AtSHR* chez *A.thaliana* (Lee, Colinas et al. 2006). En effet, sa fonction dépend de la concentration de sa protéine et de la régulation de son mouvement (Koizumi, Hayashi et al. 2012; Koizumi, Hayashi et al. 2012). Une baisse du niveau d'expression protéique dans les cellules d'endoderme induit leur division péricleinale et la formation de middle cortex. De plus, il a été démontré que l'absence de la protéine *AtSHR* inhibe la division péricleinale initiale à l'origine de l'endoderme (Helariutta, Fukaki et al. 2000), et qu'au contraire, son expression ectopique engendre une augmentation des divisions du tissu interne et la formation de couches surnuméraires de cortex (Cui, Levesque et al. 2007; Wu, Lee et al. 2014). Les résultats obtenus suite à l'analyse des lignées surexprimeurs chez le riz (Chapitre 2) et ceux obtenus par nos collaborateurs concernant la complémentation du mutant *shr-2* par les orthologues de *SHR*, suggèrent une conservation de fonction entre les orthologues *SHR*. Il est donc possible que ce mécanisme de régulation post-transcriptionnelle soit maintenu chez le riz.

Cette hypothèse pourrait être testée par l'utilisation des fusions traductionnelles déjà disponibles au laboratoire. Ces dernières pourraient être utilisées afin de mesurer le niveau de fluorescence au sein d'un tissu où sont exprimées les protéines *SHR*. Si ce niveau est variable au cours du développement de la plante, alors cela traduirait une régulation de l'expression de la protéine. Il serait également possible, à l'image de l'étude faite par Lee et al. sur la régulation de facteurs de transcription d'*A.thaliana*, de comparer les profils d'expression des ARNm (données par des analyses RNAseq ou puces à ADN) avec ceux des fusions transcriptionnelles (sans élément régulateurs) et avec ceux des traductionnelles. Si ces profils sont distincts, ce qui est le cas pour 25% des FT testés dont *AtSHR*, alors cela mettrait en évidence l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle (Lee, Colinas et al. 2006). Si cette hypothèse est validée par l'une ou l'autre méthode, il serait intéressant de connaître quel type de régulation est mise en place. Il en existe plusieurs types, dont celle effectuée par des petits ARN (miRNA), qui est à l'origine de la régulation de nombreux gènes et principalement de facteurs de transcription (Zhang, Pan et al. 2006). Pour mettre en évidence ce type de régulation, il serait intéressant de réaliser la construction suivante qui nécessite deux protéines rapportrices différentes : le promoteur du gène d'intérêt cloné en amont d'une première protéine rapportrice fluorescente (mCherry), suivie par la région 3'UTR d'un gène contrôle d'expression stable, suivie de la deuxième protéine rapportrice fluorescente (GFP) fusionnée au 3'UTR d'intérêt. De cette manière, la différence d'expression entre les deux protéines rapportrices devrait correspondre à une régulation différente entre les régions 3'UTR, et illustrerait ainsi les régulations subies par le gène d'intérêt étudié. Cette méthode a été mise en place puis validée sur le modèle *c.elegans* (Quéré 2014).





**Figure 11 : Localisation du transcrit *OsSHR1* pendant les étapes d'induction**

(a) Test GUS réalisé sur un grain imbibé dans de l'eau osmosée pendant 12h, avant le passage sur le milieu d'induction. Le signal est localisé au niveau de l'embryon. Barre=0.5 cm  
 (b) Test GUS réalisé sur le grain après une semaine sur le milieu d'induction. Le signal est localisé au niveau des faisceaux vasculaires des organes formés après germination, et dans les structures embryogènes formées au niveau du scutellum. Barre=0.2 cm.  
 (c) Test GUS réalisé sur le grain après deux semaines sur le milieu d'induction. Le signal est localisé au niveau des structures embryogènes du scutellum. Barre=0.2 cm.  
 (d) Test GUS réalisé sur le grain après trois semaines sur le milieu d'induction. Le signal est localisé au niveau des structures embryogènes du scutellum. Le volume du cal augmente. Barre=0.2 cm.  
 (e) Zoom sur les structures embryogènes après trois semaines sur le milieu d'induction. Le signal se centralise. Barre=0.1cm.  
 (f) Test GUS réalisé sur le grain après quatre semaines sur le milieu d'induction. Le signal est localisé au centre du cal. Barre=0.1cm



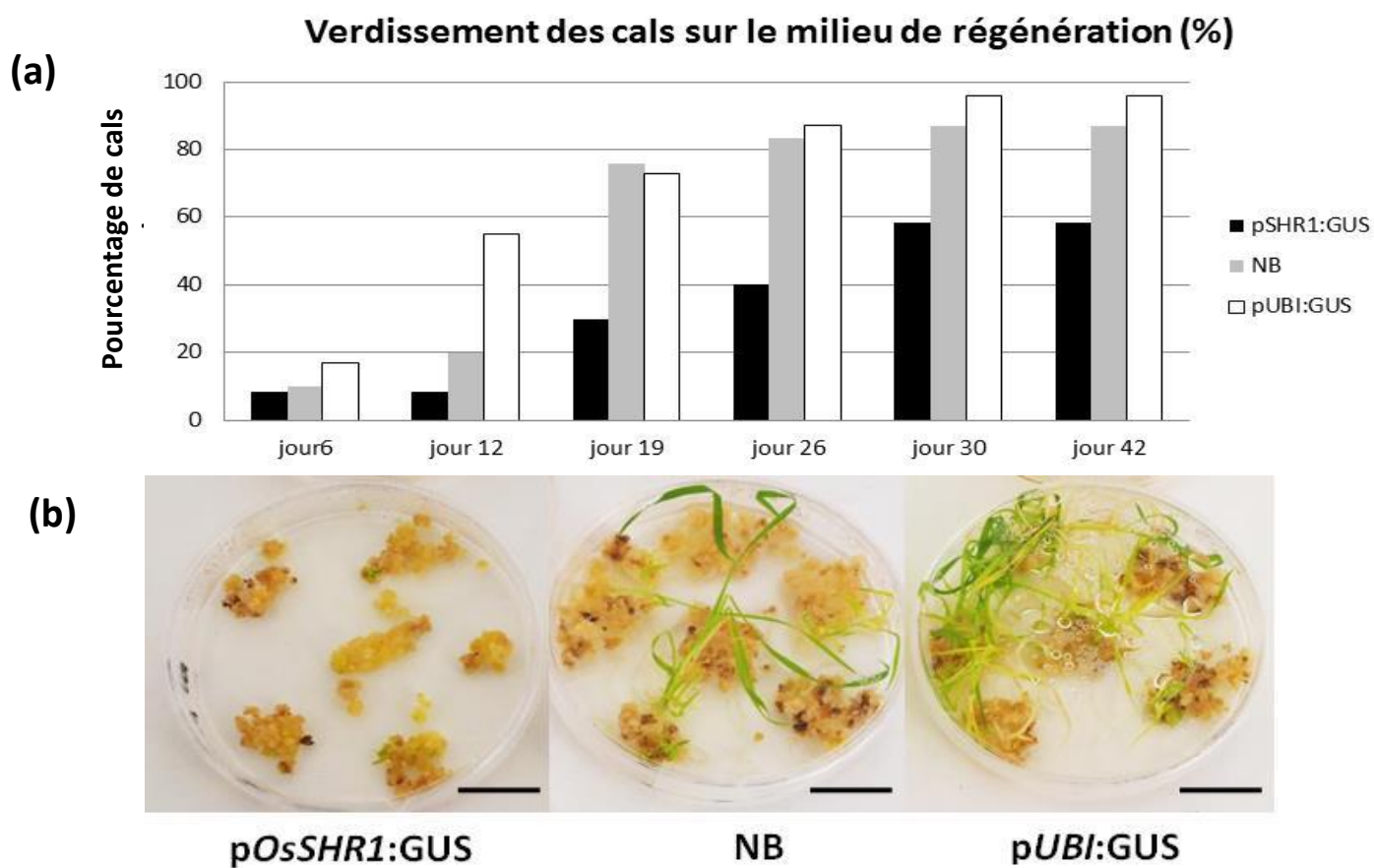
## II. Etude de l'expression d'*OsSHR1* au cours de la callogénèse et de la régénération

Les analyses présentées ci-dessus ont mis en évidence l'expression de *SHR1* dès le stade embryonnaire et la stabilité de son signal durant tout le développement de la plante. Or, nous savons que le gène *AtSHR* est exprimé très tôt durant le processus de régénération (Kareem, Durgaprasad et al. 2015). Dans l'introduction générale de ce chapitre, nous avons émis l'hypothèse que le rôle des gènes *OsSHR* durant la callogénèse serait similaire à celui des gènes *PLT1&2* chez *A.thaliana*, à savoir le maintien des cellules souches et l'acquisition de la pluripotence des cellules du cal. L'étude de Kareem et al. suggère que la régénération des cals est permise par une baisse d'expression des gènes *PLT1&2* sur le milieu riche en cytokinines, et que cela permettrait l'expression des gènes impliqués dans l'induction et la formation des organes. Si l'hypothèse que les gènes *SHR* et *PLT1&2* ont des fonctions similaires est correcte, nous devrions observer une modification du profil d'expression d'*OsSHR1* lors du passage du milieu d'induction à celui de régénération.

Cette hypothèse pourrait également expliquer les problèmes de régénération observés pour les lignées TALEN et surexprimeurs, pour lesquelles l'introduction des transgènes modifiant le niveau d'expression perturberait cet équilibre et empêcherait, ou tout du moins, perturberait la régénération des cals transformés. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons suivi le profil d'expression d'*OsSHR1* pendant la callogénèse. Cette expérience a été réalisée sur une durée de deux mois, avec des prélèvements réalisés tous les sept à dix jours. Afin de comparer la régénération à un contrôle, nous avons suivi en parallèle la régénération de cals de la variété sauvage *Nipponbare*, et afin de bénéficier d'un contrôle positif pour les tests GUS, nous avons également induit des grains d'une lignée *pUBI:GUS*.

### II.1 Profil d'expression d'*OsSHR1* sur le milieu d'induction

La régénération de cals embryogènes nécessite une succession d'étapes caractérisées par des milieux de compositions variables sur lesquels les structures embryogènes sont repiquées au cours du temps. La première étape consiste à induire des cals à partir de grains disposés sur un milieu riche en auxine (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique appelé aussi 2,4-D concentré à 2,5 g/l), qui est un milieu similaire au milieu CIM utilisé pour la callogénèse chez *A.thaliana*. Cette forte concentration en auxine et l'absence de cytokinines permet aux cellules de proliférer et de générer des structures embryogènes, qui seront capables, une fois transférées sur le milieu de régénération riche en cytokinines, de régénérer des plantes (Atta, Laurens et al. 2009). Dans l'étude de Sugimoto et al. (Sugimoto, Jiao et al. 2010), l'utilisation d'*AtSHR* comme marqueur de la stèle et du centre quiescent a mis en évidence la localisation centrale de la protéine dans le cal sur le milieu d'induction. En effet, après cinq



**Figure 12 : Retard de régénération des différents construits.**

*pSHR1:GUS* (n=200) ; *Nipponbare* (n=280) et *pUBI:GUS* (n=183)

(a) Graphique illustrant le pourcentage de verdissement des cals pour chacun des construits pendant les 5 semaines de régénération.

(b) Photo des boîtes de cals après trois semaines sur le milieu de régénération : les cals de la lignée *pSHR1:GUS* sont en retard comparé à ceux de *Nipponbare* et ceux de la lignée *pUBI:GUS*. Barres=2.5cm

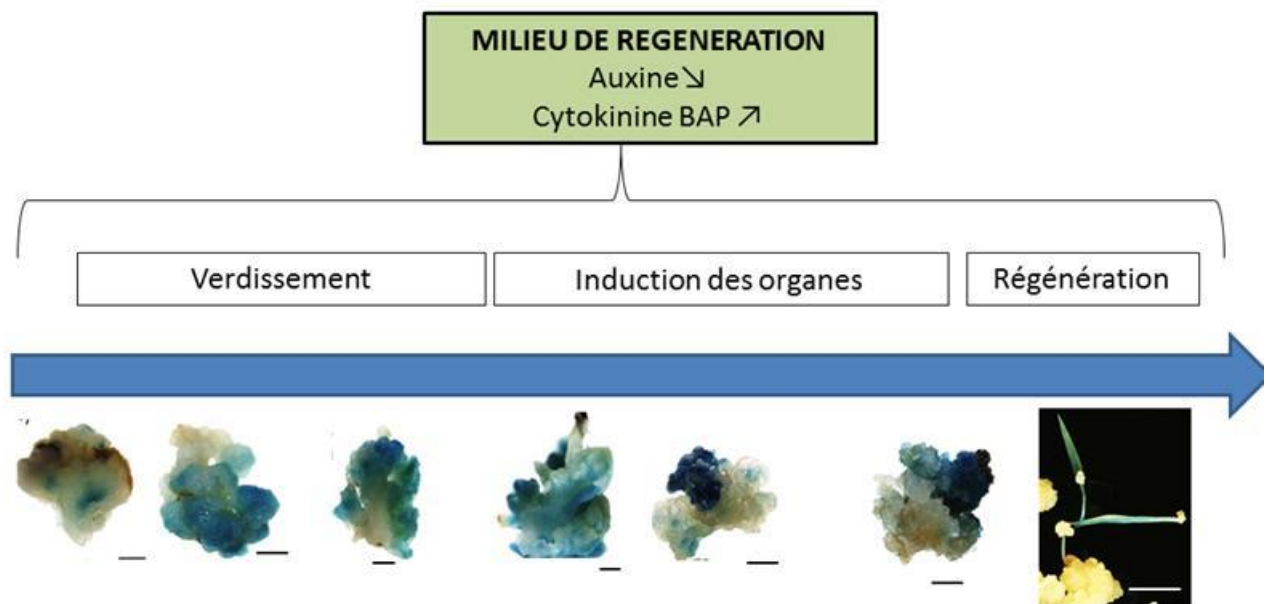
jours passés sur le milieu CIM, la protéine est retrouvée au centre du cal, avec une localisation stable dans le temps (entre le 5<sup>ème</sup> jour et le 12<sup>ème</sup> passé sur le milieu CIM). Cette étude a permis de rapprocher les organisations du cal à celle d'un méristème racinaire, où AtSHR est connue pour être localisée dans la stèle et dans le QC (Nakajima, Sena et al. 2001). Sachant que le transcrit *OsSHR1* présente le même profil dans la racine de riz (Chapitre 2, **Figure 26**) que chez *A.thaliana*, nous nous attendions donc à observer un profil semblable pour ce gène dans le cal, avec un signal stable pendant les cinq semaines d'induction.

Durant les trois premières semaines sur le milieu d'induction, le grain forme des structures embryogènes au niveau du scutellum et du coléoptile. Seules les structures embryogènes formées au niveau du scutellum donneront des structures secondaires qui pourront régénérer en embryons somatiques après le passage sur le milieu riche en cytokinines. Nous nous sommes donc intéressés au signal dans cette région. Les tests GUS ont révélé une localisation homogène dans toute la structure pendant les deux premières semaines (**Figures 11 a et b**), avec une centralisation progressive du signal, dès l'apparition des structures embryogènes secondaires au cours de la troisième semaine (**Figure 11 c**). A quatre semaines les cals secondaires ont été prélevés du grain et transférés sur une nouvelle boîte contenant le même milieu d'induction. Cette phase est appelée la phase de multiplication et est caractérisée par la prolifération des cellules des cals secondaires. A partir de ce stade, le signal d'*OsSHR1* s'est restreint à la partie centrale des cals secondaires (**Figures 11 d à f**). Le profil d'expression du gène est donc, à l'image de celui d'*AtSHR* chez *A.thaliana*, stabilisé au centre du cal dès la formation des structures embryogènes.

## II.2 Profil d'expression d'*OsSHR1* sur le milieu de régénération

Une fois les structures embryogènes formées et développées, elles sont placées sur un milieu dit de régénération riche en cytokinines, comparable au milieu SIM de la callogénèse chez *A.thaliana*. La présence de cytokinines permet l'induction de la formation d'embryons somatiques puis l'émergence des tiges et des racines (Che, Lall et al. 2006). Si l'on se base sur l'hypothèse émise précédemment, nous devrions observer une diminution du signal causé par les cytokinines. Cette baisse de signal correspondrait à une baisse d'expression des gènes maintenant les cellules souches et permettrait alors la régénération des organes sur les cals.

Après deux semaines passées sur le milieu de régénération, nous nous sommes aperçus que les cals p*OsSHR1*:GUS présentaient un retard important dans le processus de régénération. En effet, après 10 jours passés sur le milieu riche en cytokinines, nous avons remarqué que le stade verdissement des cals était amorcé pour les des deux lignées contrôle avec près de 20 % des cals pour *Nipponbare* et 50% pour p*UBI*:GUS, alors que les cals *OsSHR1* étaient à peine à 10 % (**Figure 12 a**). Ce retard a été conservé durant toute la durée de la régénération. Après six semaines (42 jours) des organes avaient émergé pour les deux lignées contrôles tandis que les cals p*OsSHR1*:GUS présentaient une régénération ralentie avec à peine 60% de cals présentant des verdissements et quasiment aucun organe formé



**Figure 13 : Localisation du transcrit *OsSHR1* pendant les étapes de régénération.**

- (a) Test GUS réalisé sur le cal après quatre semaines sur le milieu d'induction, juste avant le transfert sur le milieu de régénération. Le signal est localisé au centre du cal. Barre=0.1cm
- (b) Test GUS réalisé sur le cal après 1 semaine sur le milieu de régénération. Le signal s'intensifie et diffuse vers les couches externes du cal. Barre=0.2 cm
- (c) Test GUS réalisé sur le cal après 2 semaines sur le milieu de régénération. Le signal a diffusé dans les parties externes du cal. Barre=0.2 cm
- (d) Test GUS réalisé sur le cal après 3 semaines sur le milieu de régénération. Le signal a diffusé dans les parties externes du cal. Barre=0.2 cm
- (e) Test GUS réalisé sur le cal après 4 semaines sur le milieu de régénération. Le signal a diffusé dans les parties externes du cal et se concentre dans une partie et perd en intensité dans le reste du cal. Barre=0.2 cm
- (f-g) Test GUS réalisé sur les cals après 6 semaines sur le milieu de régénération. Le signal a diffusé dans une partie du cal et perd en intensité dans le reste du cal. Barre=0.2 cm
- (h) Test GUS réalisé sur les cals après 8 semaines sur le milieu de régénération. Le signal a disparu du cal et se concentre sur les organes formés. Barre=0.5 cm

(**Figure 12 b**). Ce retard de régénération était surprenant puisque la même lignée p*OsSHR1*:GUS avait déjà été produite au laboratoire à deux reprises, et aucun problème de régénération n'avait été observé. En effet, au cours du travail de thèse, la lignée p*OsSHR1*:GUS avait été utilisée comme lignée contrôle lors de la génération des plantes p*OsSHR1*:*SHR1*:GFP, et présentait un taux de régénération de 84 %. Ces résultats nous invitent donc à être vigilants sur les interprétations.

Juste avant le passage sur le milieu de régénération, le signal central d'*OsSHR1* dans le cal avait été observé (**Figure 13 a**). Une fois le transfert sur le milieu de régénération, nous avons remarqué une intensification du signal et une diffusion de celui-ci vers l'extérieur du cal. Durant les six semaines suivant le transfert, nous avons observé la disparition du signal central du cal au profit de sa migration vers l'extérieur des structures secondaires (**Figures 13 b à d**). Ces observations sont exactement l'inverse de celles faites pour le signal d'*OsSHR1* sur le milieu d'induction, où le signal devenait de plus en plus central. Après sept semaines, une diminution du signal a été observée, avec une extinction totale à huit semaines (**Figures 13 f à h**). A ce stade, le seul signal détecté a été localisé dans les feuilles émergées du cal. L'expression du gène serait donc concentrée dans les organes émergeant au détriment du cal en cours de régénération. Pour conclure, le profil d'expression d'*OsSHR1* serait d'abord central puis diffuserait dans les zones en périphérie du cal jusqu'à une extinction totale du signal lors de l'émergence des organes, suggérant que l'absence du gène est nécessaire à l'organogénèse.

### II.3 Conclusion : rôles d'*OsSHR1* durant la callogénèse et la régénération

Le suivi du profil d'*OsSHR1* durant la callogénèse a permis de mettre en évidence un rôle potentiel au cours des différentes étapes. En effet *SHR1* est exprimé très tôt lors de la formation du cal. Sur le milieu d'induction riche en auxine, *SHR1* est exprimé d'abord dans toutes les cellules, puis peu à peu son expression se relocalise au centre du cal. Lorsque le cal est transféré sur un milieu de régénération, l'expression de *SHR1* s'intensifie et diffuse vers l'extérieur du cal, où se localisent les cellules en différenciation. Nous pouvons également remarquer qu'à ce stade *SHR1* accompagne la différenciation des cellules jusque dans la formation des organes. L'expression de *SHR1* est alors inhibée au profit des organes émergents. L'expression du gène évolue dans le temps, et pourrait donc être impliquée dans le début du processus de formation des embryons somatiques. En particulier, l'expression de *SHR1* devient nulle lors de l'émergence des organes suggérant que les défauts de régénération observés pour les surexprimeurs pourraient être dus à l'expression ectopique des homologues de *SHR* à un stade où elle est incompatible avec la régénération. Il existerait donc une corrélation entre l'absence de *SHR* et la formation d'organes lors de la régénération ; mais il est encore trop tôt pour parler de relation de cause à effet entre ces deux événements. Il nous manque en effet des données telles que la localisation de la protéine durant ces étapes, savoir si elle est mobile et si contrairement au transcrit elle est



exprimée partout. Il faudrait également confirmer l'absence de *SHR* par le biais d'analyses moléculaires (RT-PCR, qRT-PCR).

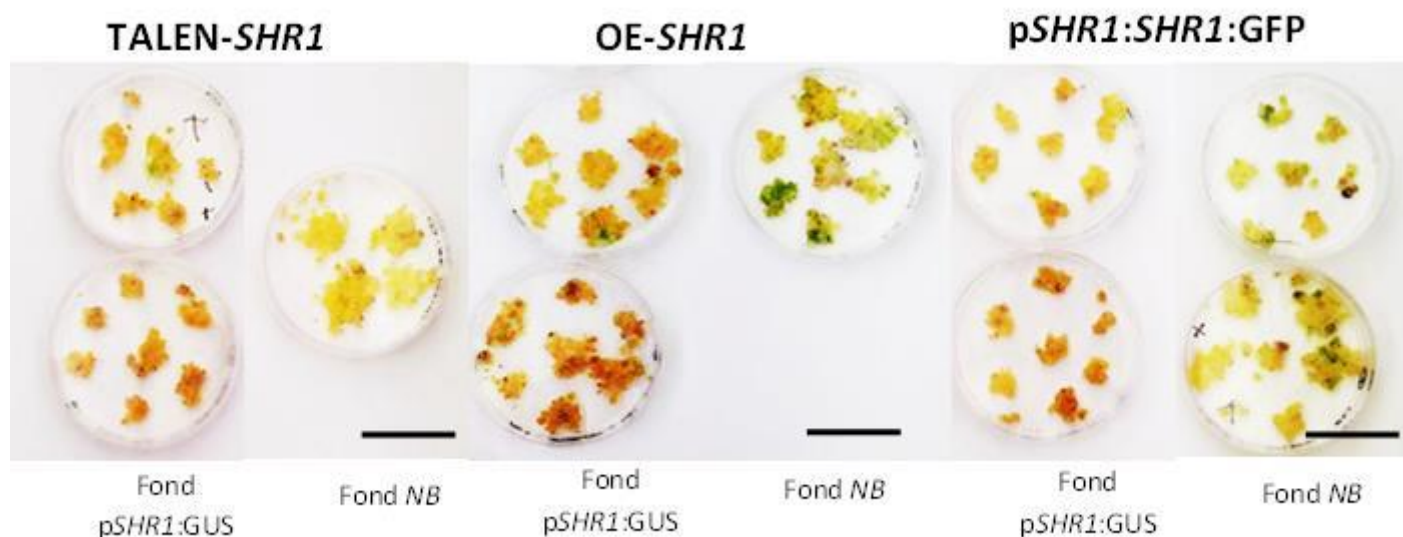
Pour conclure, ces observations suggèrent que le gène *SHR1* pourrait jouer un rôle important pendant la callogénèse. Il aurait d'abord un rôle dans le maintien des cellules souches pendant les phases d'inductions, durant lesquelles il est localisé au centre du cal. A ce stade il aurait donc un rôle semblable à celui des gènes *PLT1&2* décrits dans l'introduction de ce chapitre (Kareem, Durgaprasad et al. 2015). Ensuite, après modification de son profil d'expression et la relocalisation de son transcrit vers l'extérieur du cal, *SHR1* aurait un rôle dans l'initiation de la spécification des cellules en différents tissus. Enfin, la disparition de l'expression de *SHR1* serait nécessaire à l'émergence ou la formation des organes lors de la régénération, en particulier des organes aériens, incluant le méristème apical. L'utilisation de lignées pINDEX:*SHR1*, qui permettraient d'induire l'expression de *SHR1* après application de dexaméthasone sur le cal, donneraient la possibilité de vérifier que l'expression ectopique à un stade donné de *SHR1* stimule l'embryogénèse somatique (verdissement des cals) et bloque l'organogénèse (émergence des organes).

L'obtention récente de mutants KO par la technologie des CRISPR/Cas9 (cf. Chap. II) nous donne des informations supplémentaires quant au fonctionnement des gènes *SHR* pendant la callogénèse et la régénération. En effet, nous n'avons observé aucun problème de régénération pour les deux lignées KO *shr1* et *shr2*. Ce résultat suggère soit qu'il existe une redondance fonctionnelle entre les 2 gènes *SHR* et que par conséquent la présence d'un seul des gènes suffise à la régénération, ou bien qu'aucun de ces gènes ne soit nécessaire à cette étape, et que, dans le cas d'une expression ectopique de l'un d'entre eux, cela perturbe la régénération. De plus, le fait que la régénération des construits transgéniques *SHR1* posent plus de problèmes que les construits *SHR2* pourrait être expliqué par le fait que la protéine *SHR1* est moins mobile que son paralogue. L'analyse de la régénération du double mutant *shr1:shr2* permettrait de tester ces deux hypothèses. Si la régénération du double mutant est perturbée, alors cela validerait l'existence d'une redondance fonctionnelle de ces gènes durant de processus. Et au contraire, si aucun problème de régénération n'est rencontré, cela signifierait qu'aucun de ces gènes n'est essentiel à ce processus, et que leur non-expression est bien nécessaire à l'organogénèse. Ce résultat invaliderait également les hypothèses précédentes concernant les éventuelles fonctions de *SHR1* durant les différentes étapes de la régénération.

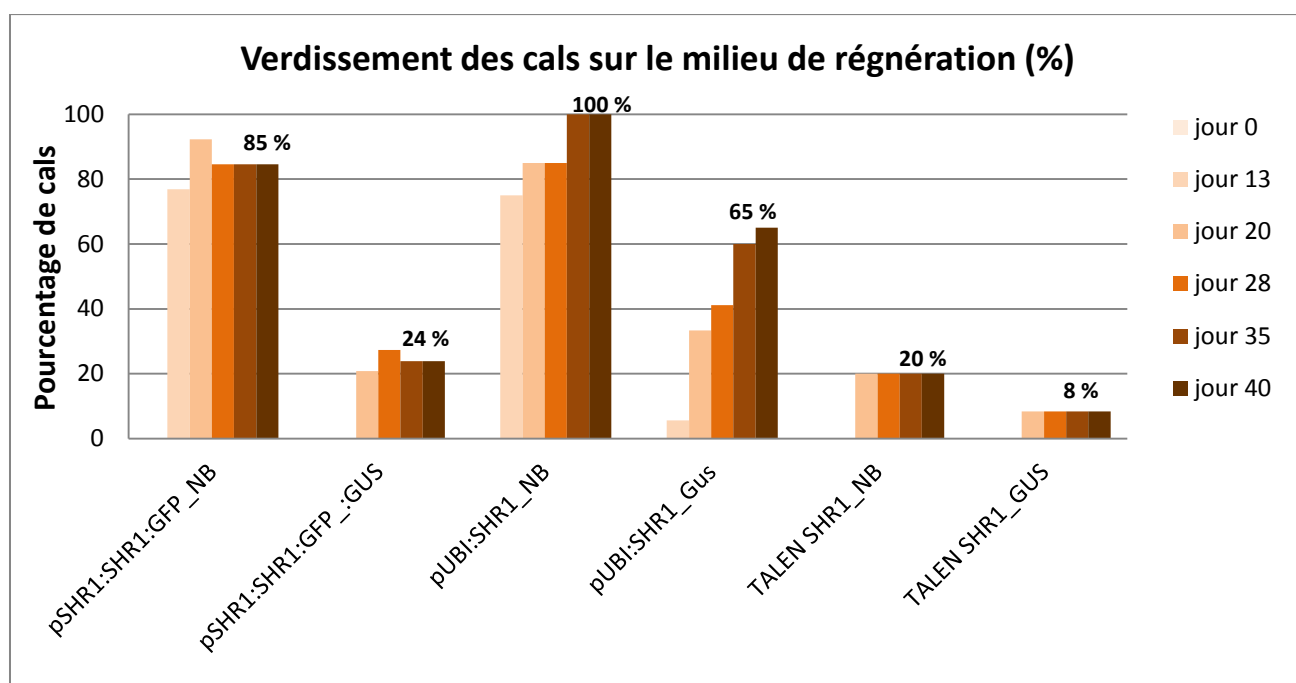
La non-régénération de la lignée TALEN *SHR1* reste cependant inexpliquée. La première interprétation était que l'extinction du gène empêchait la régénération, mais l'obtention de plantes KO réfute cette hypothèse. Il est néanmoins possible que ce TALEN ait affecté l'expression des deux gènes *SHR* ou celles d'autres gènes dans les cals, empêchant ainsi leurs régénérations. Une analyse transcriptomique des cals des différents construits (OE, KO, TALEN, et WT) permettrait d'avoir une idée des mécanismes survenant durant ce processus.



(a)



(b)



**Figure 14 : Retard de régénération des construits dans le fond pSHR1:GUS.**

pSHR1:SHR1:GFP dans fond le *Nipponbare* (n=14) et dans le fond pSHR1:GUS (n=35) ; TALEN *SHR1* dans le fond *Nipponbare* (n=4) et dans le fond pSHR1:GUS (n=14) ; OE *SHR1* dans fond *Nipponbare* (n=7), dans fond pSHR1:GUS (n=21)

(a) Photo des boîtes de cals après trois semaines sur le milieu de régénération : les cals transformés dans le fond pSHR1:GUS sont en retard comparé à ceux transformés dans *Nipponbare*. Barres=2.5cm

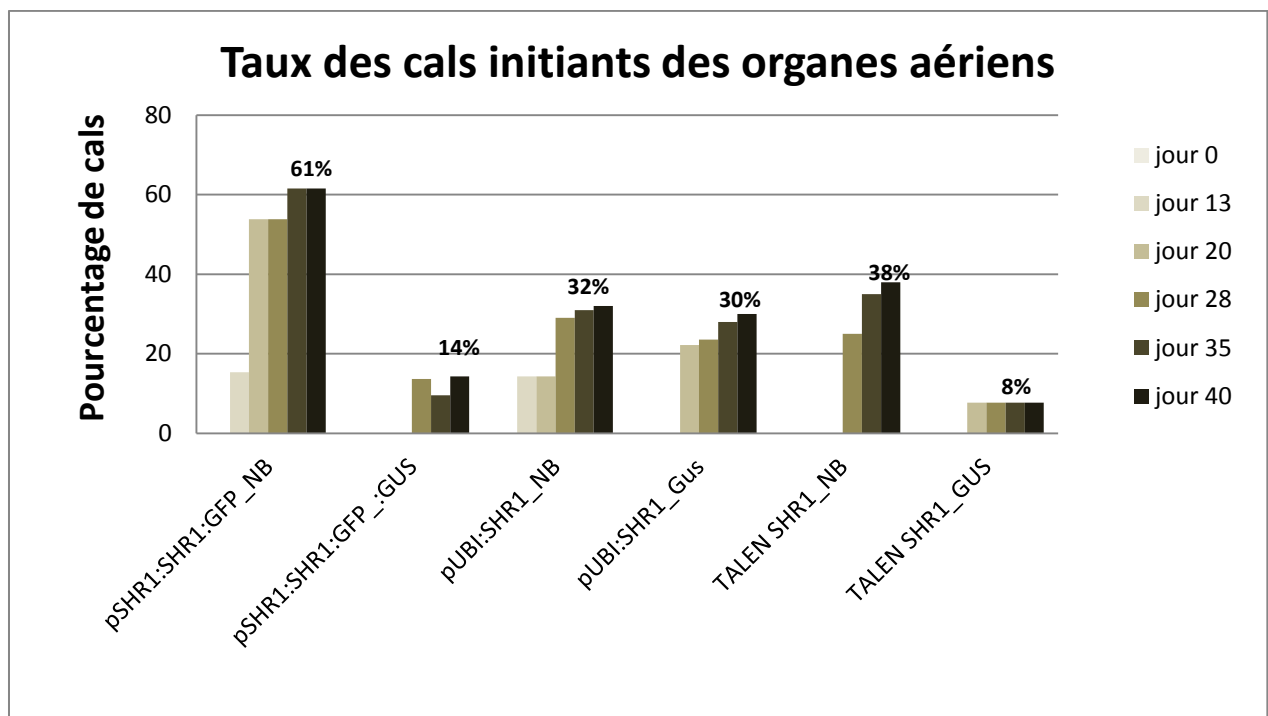
(b) Graphique illustrant le pourcentage de verdissement des cals pour chacun des construits pendant les 5 semaines de régénération.

### III. Etude de la régénération des plantes transgéniques *OsSHR1*

Nous avons reproduit les lignées transgéniques OE *SHR1*, TALEN *OsSHR1* et *pSHR1:SHR1:GFP* que nous avons transformées dans des cals *pSHR1:GUS*. Cette expérience a été réalisée dans le but de comprendre les problèmes de régénération rencontrés précédemment. Si l'introduction du transgène (TALEN, surexprimeurs,...) modifie le niveau d'expression d'*OsSHR1* dans le cal, et si le gène est capable d'auto-activation pendant les étapes de callogénèse, alors nous nous attendons à observer cette modification d'expression grâce au profil GUS du gène dans le cal. Dans ce cas nous nous attendons à observer une réduction du signal GUS dans la lignée TALEN-*SHR1* et une augmentation dans les lignées OE *SHR1* et *pSHR1:SHR1:GFP*. Cependant, nous avons déjà démontré qu'il n'y avait pas d'autorégulation dans la plante des gènes *OsSHR1* et *OsSHR2* grâce à l'étude du niveau d'expression des gènes endogènes dans les lignées surexprimeurs. Il est néanmoins possible que des mécanismes de régulation du gène diffèrent pendant la callogénèse.

Le suivi du verdissement des cals transformés a mis en évidence un retard de régénération des cals dans le fond *pSHR1:GUS*. Ces derniers régénèrent 3 semaines plus tard que les mêmes construits transformés dans *Nipponbare* (**Figure 14 a**). Après 5 semaines (35 jours) de régénération, seulement 20% des cals *pSHR1:SHR1:GFP* dans le fond *pSHR1:GUS* présentent des structures chlorophylliennes alors que 80% des cals du même construit dans *Nipponbare* sont verts. Cette même tendance est observée pour les construits TALEN *SHR1*. Seul le construit OE *SHR1* semble montrer une meilleure aptitude à la régénération (**Figure 14 b**). Le retard de régénération a posé problème puisqu'après 8 semaines (56 jours) passées sur le milieu de régénération, les cals ont commencé progressivement à prendre une couleur ocre puis à mourir. Nous n'avons donc pas pu analyser le profil d'expression d'*OsSHR1* au stade d'émergence des plantules. Avant la mort des cals nous avons observé un blocage des cals TALEN-*SHR1* au cours de la callogénèse, comme il avait été observé lors de la transformation de ces construits (Chapitre 2.III.2). Quant aux cals OE *SHR1*, nous avons de nouveau remarqué un blocage après le stade verdissement avec seulement 30 % des cals qui ont régénéré en plantules dans le fond *pSHR1:GUS* et 32 % dans le fond *NB* (contre 27.9% observés lors de la transformation génétique dans *Nipponbare*) (**Figure 15**).

Les profils GUS dans les cals des différents construits ont été suivis pendant 6 semaines consécutives et comparés à ceux observés chez les cals *pSHR1:GUS* (**Figure 16**). Pour chacun des construits nous avons bien observé un signal au centre du cal lors de la première semaine de régénération, suivi d'une diffusion progressive vers l'extérieur des cals. Contrairement à la localisation du transcrit *SHR1* qui était stable entre les construits, l'intensité du signal était très variable d'un cal à l'autre. Nous nous sommes donc intéressés à la localisation du signal et non à son intensité. Après 7 semaines (50 jours de régénération), seul le construit OE *SHR1* a pu être analysé au stade d'émergence des tiges, pour lequel nous avons relevé un profil GUS semblable à celui observé chez la lignée *pSHR1:GUS*. En effet, le signal a disparu du cal pour se concentrer dans les parties émergentes.



**Figure 15 : L'émergence des organes est ralentie chez les cals transgéniques du fond *pSHR1:GUS*.**

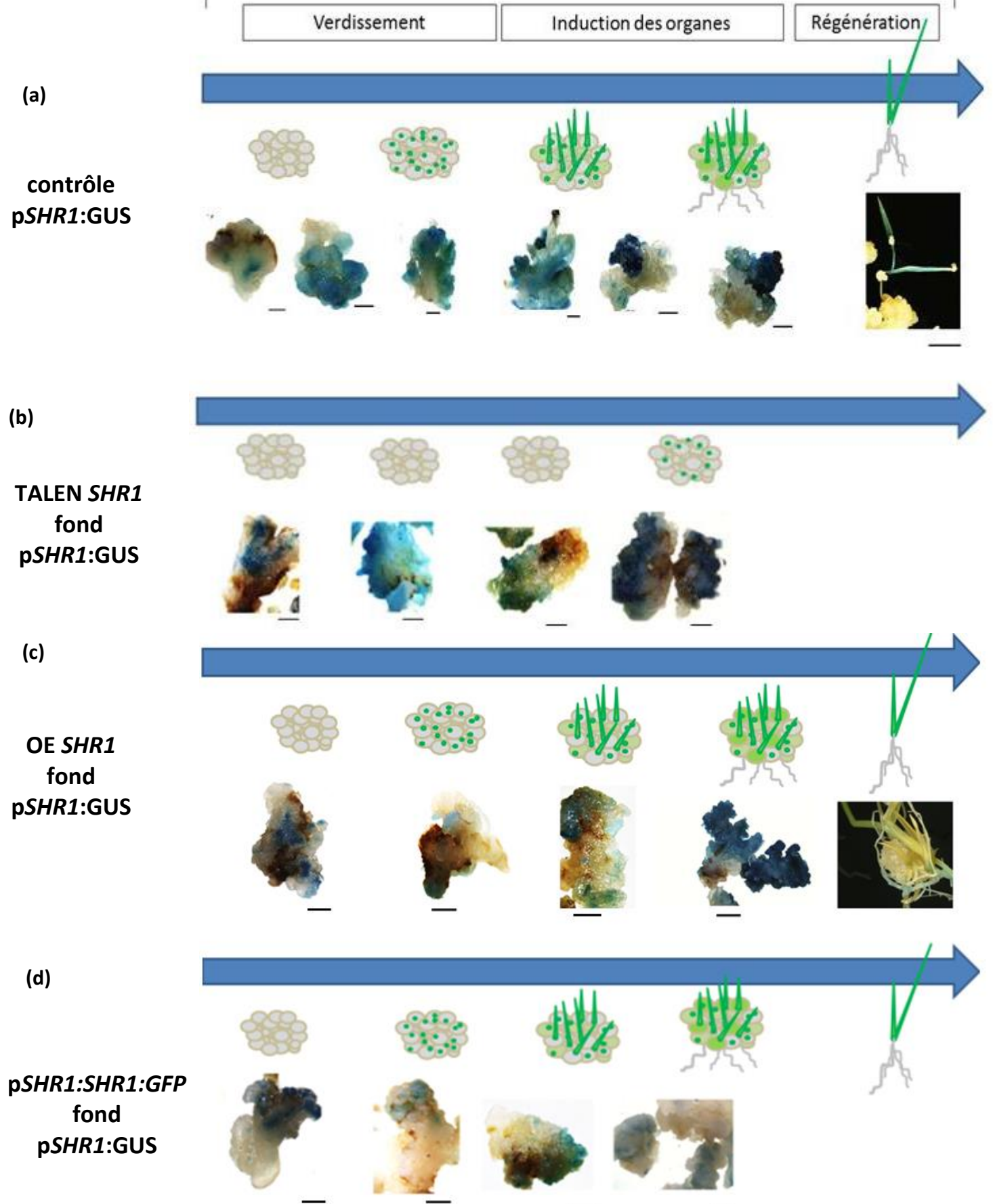
*pSHR1:SHR1:GFP* dans fond Nipponbare (n=14), dans fond *pSHR1:GUS* (n=35) ; TALEN *SHR1* dans fond Nipponbare (n=4), dans fond *pSHR1:GUS* (n=14) ; OE *SHR1* dans fond Nipponbare (n=7), dans fond *pSHR1:GUS* (n=21).

Graphique illustrant le pourcentage des cals présentant des ébauches d'organes (tiges et racine) pour chacun des construits pendant les 6 premières semaines de régénération. Les cals du fond *pSHR1:GUS* montrent un ralentissement dans la régénération, d'autant plus fort pour la lignée TALEN *SHR1*.

**Figure 16 : Localisation du transcrit *SHR1* pendant les étapes de régénération des lignées transgéniques *SHR1* dans le fond *pSHR1:GUS*. Barres=0.2 cm**

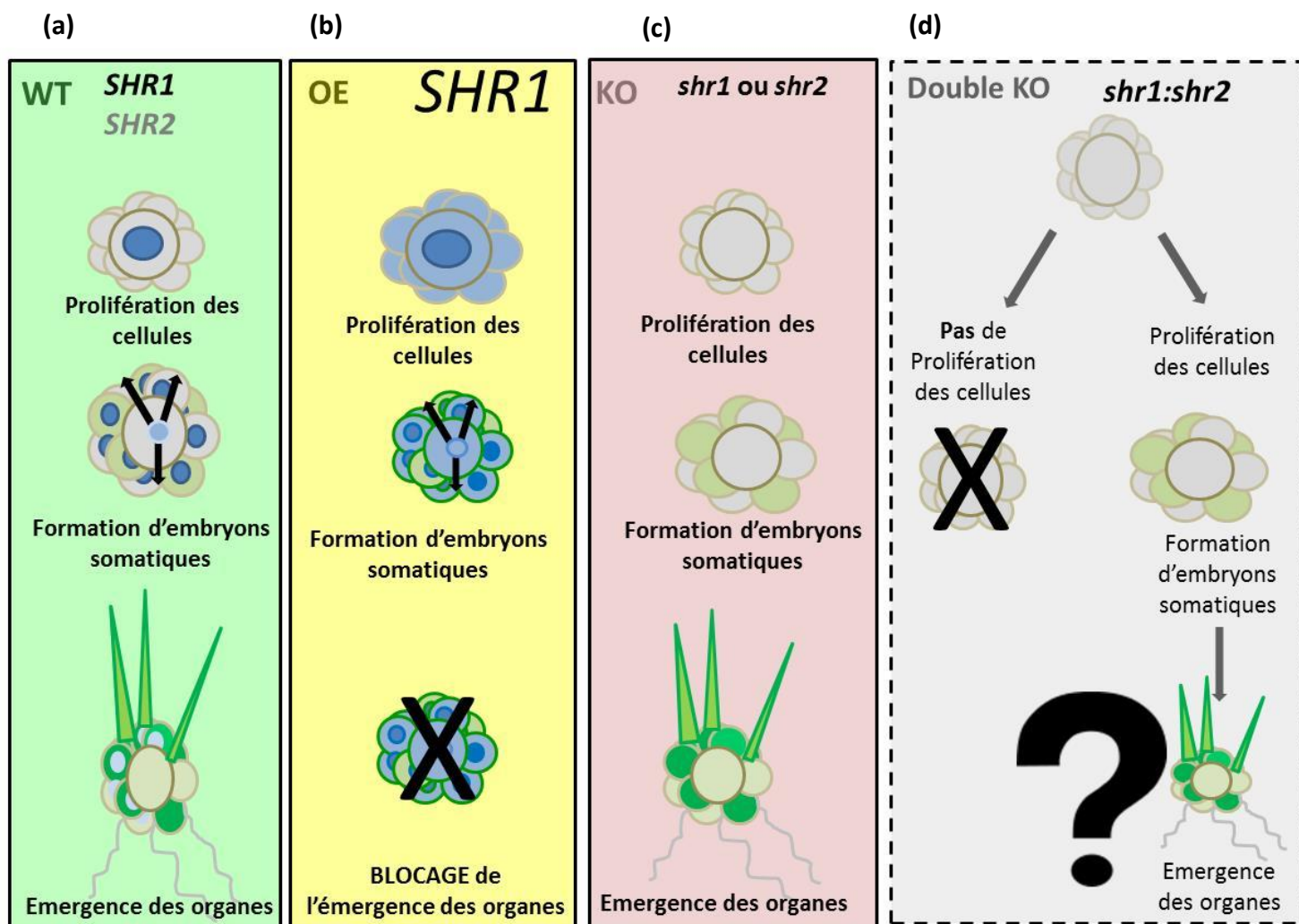
- (a) Test GUS réalisé sur les cals *pSHR1:GUS* durant les étapes de régénération.
- (b) Test GUS réalisé sur les cals TALEN *SHR1* dans le fond *pSHR1:GUS* durant les étapes de régénération.
- (c) Test GUS réalisé sur les cals OE *SHR1* dans le fond *pSHR1:GUS* durant les étapes de régénération.
- (d) Test GUS réalisé sur les cals *pSHR1:SHR1:GFP* dans le fond *pSHR1:GUS* durant les étapes de régénération.

# MILIEU DE REGENERATION





Pour conclure, les profils d'expression observés dans les cals transformés ne diffèrent pas de ceux observés pour les cals p*SHR1*:GUS. On ne peut donc pas apporter d'explications quant aux mécanismes de blocage encourus lors des étapes de régénération observés chez les lignées transgéniques. Cette expérience permet néanmoins d'affirmer que le gène *OsSHR1* est incapable d'auto-activation que ce soit pendant la callogénèse ou pendant le développement de la plante.



**Figure 17 : Schéma sur les potentielles régénérations de différentes lignées transgéniques *SHR1*.**

(a) Régénération observée pour cal un cal *Nipponbare* transformé avec p*SHR1*:GUS. L'expression du transcrit *SHR1* est d'abord localisé au centre du cal. Le cal est ensuite transféré sur le milieu de régénération où le signal est relocalisé vers les structures secondaires et induit la formation d'embryons somatiques. L'expression de *SHR1* finit par diminuer et permet l'émergence des organes feuilles et racines ce qui conduit à la formation d'une plante.

(b) Régénération observée pour cal un cal *Nipponbare* transformé avec pUBI:*SHR1*. L'expression ectopique de *SHR1* empêche limite l'émergence des organes, suggérant que cette baisse d'expression soit nécessaire à la formation des organes.

(c) Régénération observée pour cal un cal *Nipponbare* transformé avec CRISPR/Cas9 *SHR1*. *SHR1* et *SHR2* individuellement, ne semblent pas être nécessaires à l'étape de régénération.

(d) Le double mutant *shr1 :shr2* nous permettra de savoir si leurs fonctions sont redondantes (pas de régénération) ou si aucun des gènes n'est nécessaire à la régénération (émergence des organes sur les cal).



## IV. Conclusion générale : rôle de *SHR1* dans la callogénèse

L'étude du rôle des gènes *SHR* dans l'architecture racinaire a nécessité l'utilisation de lignées transgéniques modifiant les niveaux d'expression dans la plante. Les problèmes de régénération rencontrés pour certaines de ces lignées (surexprimeurs, TALEN) ont mis en exergue un potentiel rôle de ces gènes lors de ce processus, et plus particulièrement un rôle plus important de *SHR1* pour lequel les taux de régénération observés étaient bien plus faibles. Ce constat nous a amené à étudier le profil transcriptionnel de ce gène au cours de la callogénèse, de la régénération et du développement de la plante. Les résultats nous ont permis d'émettre plusieurs hypothèses quant à son fonctionnement au cours de ces étapes.

Les analyses menées dans cette étude ont permis de mettre en évidence une expression stable du transcrit *SHR1* au cours du développement de la plante, et la non-influence des facteurs environnementaux (hormone, lumière, stress abiotiques) sur cette expression. Cependant la similarité de fonction entre les gènes *SHR* de riz et leur orthologue *AtSHR* a soulevé la possibilité d'une éventuelle régulation post-transcriptionnelle pour les gènes monocotylédones. Cette hypothèse pourrait être validée, de la même manière que cette régulation a été démontrée pour *AtSHR*, par le suivi de l'expression de protéines rapportrices des fusions traductionnelles et transcriptionnelles (Lee, Colinas et al. 2006; Koizumi, Hayashi et al. 2012). Nous avons réalisé des fusions traductionnelles pour les 3 gènes *SHR* (cf. Chapitre 2. II), pour lesquelles nous attendons la génération T1 pour poursuivre nos analyses.

L'étude de la régénération des différentes lignées transgéniques (OE et CRISPR) nous a permis d'émettre plusieurs hypothèses quant au rôle de *SHR1* durant ce processus. Les lignées KO *shr1* et *shr2* ont montré peu de problèmes de régénération (presque 60 % des cals ont régénérés); contrairement aux lignées surexprimeurs qui présentaient 28 % et 43% de cals régénérant pour les lignées OE *SHR1* et OE *SHR2* respectivement. Ce résultat supposerait qu'aucun des gènes *SHR* n'est nécessaire à la régénération, ou bien que ces deux gènes ont des fonctions redondantes durant la callogénèse. Dans les deux cas les problèmes rencontrés pour les lignées surexprimeurs pourraient être expliqués par l'expression ectopique de la protéine lors de l'organogénèse. En effet, nos résultats suggèrent l'existence d'une corrélation entre une baisse/extinction de l'expression de *SHR1* et l'émergence des organes sur les cals. Le recours à des lignées inducibles pour les deux gènes *SHR* ainsi qu'un double mutant *shr1:shr2* nous permettrons de trancher entre ces deux hypothèses (**Figure 17**).

Il est également important de souligner que les construits des lignées transgéniques étudiées ne comportent aucun motif 3'UTR. S'il existe en effet une régulation post-transcriptionnelle, il est fort probable qu'elle soit exercée par cet élément et non par le 5'UTR. Ce dernier est présent dans la fusion transcriptionnelle *pSHR1:GUS* qui s'avère être très stable dans le temps. De plus, le 3'UTR a été démontré comme fortement impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes participant à des processus développementaux tels que la prolifération des cellules souches, les divisions cellulaires et le



déterminisme des destinées cellulaires (Kuersten and Goodwin 2003). Il serait alors intéressant d'évaluer l'existence de cette régulation et d'étudier la régénération de cals surexprimeurs comprenant le 3'UTR et noter si celle-ci s'est améliorée.



# **Discussion et Perspectives**



L'Equipe DAR, au sein de laquelle j'ai effectué ma thèse, s'intéresse au développement racinaire du riz, et plus particulièrement à la mise en place des tissus internes. Dans le cadre de cette thématique, mon travail de thèse consistait à caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans cette mise en place, en se focalisant sur le cortex. Ce tissu présente un rôle structurel, fonctionnel et adaptatif essentiel chez le riz. Les tissus internes d'*A.thaliana* se limitent à une couche de cortex et une couche d'endoderme. Cette organisation est différente pour le riz, chez qui on retrouve une couche de sclérenchyme et d'exoderme en périphérie, et la présence d'un nombre variable de couches de cortex. Ce nombre de couches dépend du type de racine, du stade de développement et des conditions environnementales. J'ai donc, dans un premier temps, réalisé une étude approfondie des particularités du cortex chez le riz (Chapitre 1). Le gène *AtSHR* d'*A.thaliana*, codant pour un facteur de transcription de la famille GRAS, a été identifié comme un acteur clé dans la mise en place des tissus internes. J'ai ensuite initié l'étude fonctionnelle de ses orthologues putatifs chez le riz nommés *OsSHR1* et *OsSHR2*, et tenté d'identifier leurs rôles respectifs dans la mise en place des tissus racinaires chez le riz (Chapitre 2). Enfin, j'ai initié à la fin de ma thèse des expériences qui avaient pour but de comprendre le rôle des gènes *OsSHR1* et *OsSHR2* au cours de la callogénèse (Chapitre 3).

Une partie de ce travail a été mené en collaboration avec l'équipe de K. Gallagher de l'université de Pennsylvanie, qui s'intéresse au développement racinaire chez *A.thaliana*, et plus particulièrement au rôle d'*AtSHR* dans ce processus. Cette équipe a récemment mis en évidence l'existence d'une conservation de fonction entre *AtSHR* et ses orthologues chez *Brachypodium distachyon* (*BdSHR*) et le riz (*OsSHR1* et *OsSHR2*) (Wu, Lee et al. 2014). Cette conservation a également été démontrée pour le gène *PtSHR* de peuplier (Wang, Andersson-Gunneras et al. 2011). Ces orthologues sont capables de restaurer la formation et l'identité de la couche d'endoderme disparue chez le mutant *shr-2* d'*A.thaliana*. Plus surprenant, les trois gènes de monocotylédones induisent la formation de couches surnuméraires de cortex, en raison d'une mobilité plus importante de leurs protéines que celle de leur co-orthologue *AtSHR* (Wu, Lee et al. 2014). Cette étude a suggéré l'existence d'une corrélation entre un gradient de protéines *SHR* et la formation d'un nombre plus ou moins important de couches surnuméraires de cortex. Ce travail a permis d'aboutir à l'hypothèse suivante : une modification des propriétés de mobilité des protéines *SHR* pourrait expliquer les différences de nombres de couches entre *A. thaliana*, qui ne possède qu'une couche de cortex, et le riz, pour qui le nombre de couches peut s'élever à 12. Plusieurs questions sont alors soulevées : Quel est le rôle respectif des gènes *OsSHR1* et *OsSHR2* dans la mise en place de ce tissu ? Existe-t-il un gradient de protéines dans les pointes racinaires chez le riz ? Existe-t-il une différence de mobilité entre *OsSHR1* et *OsSHR2* ?





## Le cortex du riz présente des propriétés communes avec celui d'*A.thaliana*

L'analyse anatomique du cortex dans les différentes racines de riz a permis de mettre en évidence des propriétés communes chez ces deux espèces. Il existe deux types de cortex chez le riz, appelés outer-cortex et inner-cortex. L'outer-cortex, semblable à la couche de cortex d'*A.thaliana*, est mis en place au niveau du méristème racinaire à partir des divisions des cellules initiales (Rebouillat, Dievart et al. 2009). Chez le riz, il comprend un nombre variable de couches dépendant du type racinaire et du stade de développement. L'outer-cortex est également caractérisé par l'aptitude de ses cellules à former des aérénchymes. Ces cavités aérifères sont essentielles au bon développement du riz, puisqu'elles permettent une meilleure diffusion de l'oxygène dans les racines et une diminution des consommations énergétiques des cellules. L'inner-cortex, à l'image de la couche de middle-cortex chez *A.thaliana*, présente les mêmes spécificités anatomiques. Ses cellules ont la même forme d'ellipse aplatie, et présentent des parois plus lignifiées (Baum, Dubrovsky et al. 2002; Paquette and Benfey 2005). Chez *A.thaliana*, ce tissu a été récemment identifié comme un acteur dans la tolérance aux stress abiotiques (Cui 2015). De plus, *AtSHR* semble être impliqué dans sa formation. Une diminution transitoire du niveau d'*AtSHR* dans l'endoderme précède la division périclinale à l'origine de la formation de l'inner-cortex (Koizumi, Hayashi et al. 2012; Koizumi, Hayashi et al. 2012).

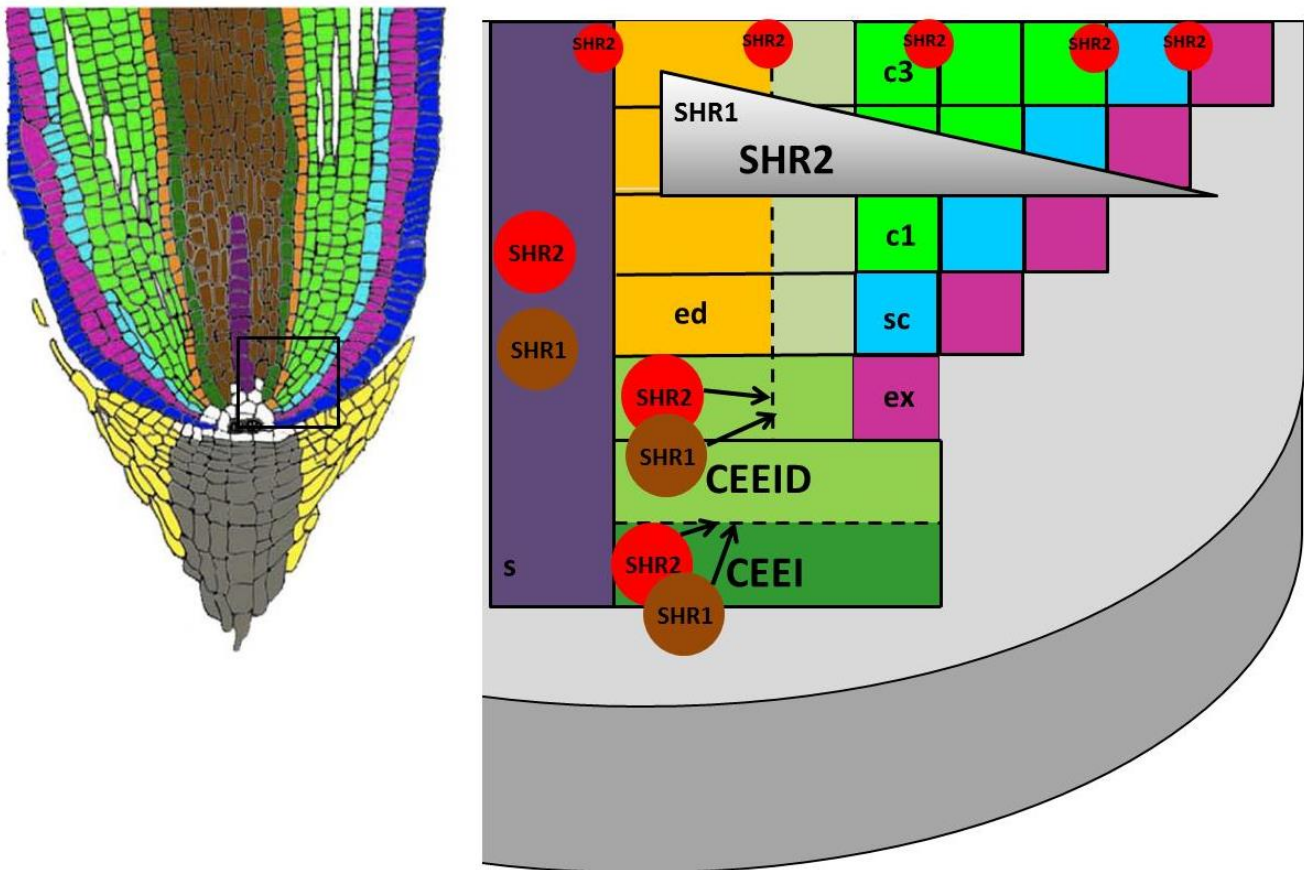
Nous avons mis en évidence l'absence d'inner-cortex dans les trois types de racines latérales. Ce résultat suggère que, à l'image du sclérenchyme qui est absent des SLR et T-LLR (Kono, Igeta et al. 1972) et qui a un rôle de soutien chez les racines présentant des diamètres plus importants, la couche d'inner-cortex devrait avoir un rôle spécifique dans les racines où elle est formée. Cette variabilité de structure interne aurait probablement un rôle fonctionnel qui reste à déterminer.

La plateforme d'imagerie MRI a récemment acquis un microscope multiphoton couplé à un vibratome. Cet outil nous a permis d'acquérir des images de coupes radiales de pointes racinaires sériées distantes de quelques microns. Nous avons donc prévu, à partir de segmentation d'images 3D, de reconstituer la mise en place des différents tissus racinaires. Ce projet de segmentation est en cours au laboratoire, en partenariat avec l'équipe Virtual Plant (INRIA, Montpellier). Notre hypothèse de travail est que la formation de l'inner-cortex résulterait de divisions démarrant soit au niveau de l'initiale CEEID, soit de divisions périclinales plus tardives de l'endoderme et que ces divisions se poursuivraient en formant une hélice dextrogyre. Après avoir compris et décrit cette mise en place, nous envisageons d'étudier le rôle des paralogues *SHR1* et *SHR2* dans ce processus. Dans un premier temps, l'analyse des mutants KO *shr1* et *shr2* nous permettra de confirmer leur implication dans cette mise en place, tel que cela a été décrit chez *A.thaliana*.



## SHR1 et SHR2 interviennent dans la mise en place du cortex

La fonction du gène *AtSHR* dans le développement et l'architecture racinaire chez *A.thaliana* est bien décrite dans la littérature. Ce gène est nécessaire à l'induction des divisions des cellules initiales à l'origine des différents tissus racinaires, au maintien du centre quiescent ainsi qu'à la spécification des tissus internes en endoderme (Long, Scheres et al. 2015). Les orthologues *OsSHR1* et *OsSHR2* sont capables de compléter le mutant *shr-2* d'*A.thaliana* (Wu, Lee et al. 2014), suggérant l'existence d'une conservation de fonction partielle. Dans le cadre de notre étude, nous avons étudié le rôle de ces gènes ainsi que celui d'*AtSHR* dans le développement racinaire du riz, et nos résultats ont mis en évidence une fonction identique de ces trois gènes dans la formation du cortex. En effet, l'expression des gènes *SHR* sous le contrôle du promoteur ubiquitine du maïs entraîne des divisions méristématiques surnuméraires, conduisant à la présence de nombreuses couches de cortex, jusqu'à six fois plus que chez les lignées contrôles. Les trois lignées transgéniques présentent des grosses racines et des feuilles surenroulées. Cependant les mécanismes responsables de l'augmentation du nombre de couches de cortex semblent différents entre les lignées surexprimeurs *SHR1* et *SHR2/AtSHR* d'autre part. En effet, il existe bien une corrélation entre la surexpression des gènes et des protéines *SHR2* et *AtSHR* et la sévérité des phénotypes observés. La surexpression de *SHR2* induit une augmentation des divisions conduisant à la formation de couches supplémentaires de cortex. Pour *SHR1*, aucune surexpression du gène ni de sa protéine n'a pu être observée parmi les plantes régénérées, alors que ces dernières présentent le même phénotype que les plantes OE *SHR2* et OE *AtSHR*. Néanmoins, ces résultats suggèrent que *SHR2* et *SHR1* aient des fonctions distinctes. D'autres résultats confortent cette hypothèse. D'une part, l'analyse des fusions traductionnelles des 3 gènes *SHR* exprimés sous le contrôle du promoteur de *SHR1* révèle la présence de phénotypes foliaires différents pour les trois constructions. Seule la lignée *pSHR1:SHR2:GFP* présente un enroulement des feuilles semblable à celui décrit chez les lignées surexprimeurs. Une hypothèse séduisante qui pourrait expliquer ce résultat, consiste à imaginer que la protéine *SHR2* aurait une mobilité supérieure à celle de ses co-orthologues *SHR1* et *AtSHR*, résultat déjà démontré chez *A. thaliana* (Wu, Lee et al. 2014). En effet, le promoteur *SHR1* s'exprime dans les faisceaux vasculaires de la racine (au niveau de la stèle) et des feuilles (au niveau des nervures). Les modifications anatomiques responsables du surenroulement des feuilles sont probablement dues à la disparition ou diminution du nombre des cellules bulliformes qui sont éloignées des tissus vasculaires, ce qui suggère une action à distance de la protéine *SHR2* dans les lignées *pSHR1:SHR2:GFP*. Il serait alors intéressant de tester cette hypothèse, en vérifiant par immunolocalisation que la protéine *SHR2* n'est pas exprimée naturellement dans les parties aériennes. D'autre part nous avons constaté de forts problèmes de régénération et de fertilité pour les lignées transgéniques surexprimeurs, mais pas pour les lignées KO. Cela signifie donc que l'expression ectopique des protéines *SHR* perturbe le développement des cals. Ce constat



### Modèle hypothétique du rôle des gènes *SHR1* et *SHR2* dans la mise en place des tissus internes de la racine de riz

*SHR1* et *SHR2* induisent la division anticlinale de la cellule initiale CEEI, ainsi que la division périclinale asymétrique de la CEEID à l'origine des différents tissus racinaires. Le nombre de couches de cortex formées, correspondant au diamètre racinaire, serait déterminé par le gradient de protéines (*SHR2* et *SHR1* à plus faible niveau). Ce gradient serait minimal dans les petites latérales et maximal dans les racines adventives les plus larges (en bas), et intermédiaires dans les autres cas.

Abréviations : Sc=Sclérenchyme ; C=cortex ; E=Endoderme ; S=stèle ; CEEID=Initiale commune épiderme/endoderme ; c1, c2, c3 première, deuxième et troisième couche de cortex formées par une division périclinale formative de la CEEID.

est d'autant plus vrai pour *SHR1*, pour qui le taux de régénération des cals de la lignée OE *SHR1* était beaucoup plus faible que ceux des lignées OE *SHR2* et *AtSHR*. Nous avons ainsi supposé, étant donné qu'aucune surexpression n'a été observée dans les plantes régénérées, que les cals présentant un niveau élevé d'expression de *SHR1* n'ont pas survécu. Ces observations ne nous permettent pas d'apporter de conclusions quant au fonctionnement de *SHR1*, mais elles suggèrent que les deux paralogues fonctionnent probablement différemment, sous-entendant ainsi une subfonctionnalisation des protéines *SHR1* et *SHR2*.

L'ensemble de ces résultats nous invitent à proposer un modèle hypothétique du fonctionnement des gènes *SHR1* et *SHR2* dans la mise en place des tissus internes racinaires : les deux protéines SHR seraient capables d'induire les divisions des cellules initiales filles (CEEID) situées dans le méristème et permettraient ainsi la formation des différentes couches de tissus internes. L'activation de ces divisions se ferait probablement avec la participation des gènes *SCR1* et *SCR2*, ce qui semble être confirmé au moins pour *SHR2*. La protéine *SHR2* aurait la particularité d'être plus mobile que *SHR1* et de se déplacer dans toutes les couches de tissus internes. Elle pourrait donc être impliquée plus spécifiquement dans la variation du nombre de couches de cortex, et agirait selon un gradient de concentration et de diffusion. Les résultats issus de la complémentarité obtenus chez *A.thaliana* supposent que les deux protéines sont nécessaires à la division anticlinale des initiales mères (CEEI) et à l'acquisition des identités des tissus internes. Cependant, sans l'analyse des mutants KO, il nous est difficile de conclure quant à la fonction exacte des gènes *SHR* dans cette mise en place chez le riz et quant à leur subfonctionnalisation.

Ce modèle présente beaucoup d'imprécisions en raison du manque de données, en particulier concernant les lignées pertes de fonction. Plusieurs outils disponibles au laboratoire pourront nous permettre d'approfondir nos connaissances sur le fonctionnement de ces gènes dans un avenir proche. La priorité consistera à analyser l'anatomie racinaire des lignées KO *shr1* et *shr2*, qui sont actuellement en serre au stade T0, afin de mettre en évidence les phénotypes associés à l'absence de chacune de ces protéines. Ces informations nous permettront de décrire leurs rôles respectifs dans la mise en place des tissus internes et de valider ou de corriger le modèle moléculaire proposé précédemment. Les doubles mutants nous permettront de révéler une éventuelle redondance fonctionnelle complète ou partielle de ces deux gènes. A cela s'ajoute l'analyse des lignées transgéniques contenant les fusions traductionnelles pour les trois gènes *SHR*, qui permettra de confirmer une différence de mobilité des protéines, de comparer leurs cinétiques de diffusion et d'effectuer une corrélation entre les concentrations protéiques et le nombre de couches de cortex formées dans les différents types de racines. Ces lignées pourront également être utilisées afin de compléter les mutants KO CRISPR. Il est tout de même important de souligner qu'à ce jour, aucun signal GFP n'a pu être clairement observé dans la génération T0. Les phénotypes observés suggèrent néanmoins que les constructions sont fonctionnelles, du moins pour *SHR2*. Nous effectuerons donc un nouveau criblage sur des plantules des lignées T1, en espérant observer un signal GFP.





## Perspectives à plus longs termes

L'ensemble de nos résultats nous a permis de proposer plusieurs hypothèses pour expliquer le fonctionnement des gènes *SHR* dans la mise en place des tissus internes chez le riz. Nos données sont encore insuffisantes pour construire un modèle complet, mais une série de résultats concernant les lignées KO ainsi que les analyses de mobilité des fusions *SHR:GFP* vont nous permettre de l'améliorer. A plus long terme, une nouvelle série d'expériences sera entreprise pour mettre en évidence une potentielle régulation post-transcriptionnelle, comprendre les mécanismes responsables de l'apparition de couches surnuméraires dans les lignées OE *SHR1* et identifier le réseau de gènes dans lequel *SHR1* et *SHR2* sont impliqués.

A plusieurs reprises les résultats obtenus ont suggéré l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle du gène *SHR1*, avec notamment le fait qu'aucune surexpression de ce gène n'ait été observé dans la lignée surexprimeur, alors que des phénotypes forts ont été induits, similaires à ceux observés chez les lignées OE *SHR2* et OE *AtSHR*. L'existence d'une régulation post-transcriptionnelle a été démontrée pour plusieurs orthologues, dont *AtSHR* (Helariutta, Fukaki et al. 2000; Lee, Colinas et al. 2006) et *PtSHR* (Jones 2011). En effet, plusieurs sites de polyadénylation dans le 3'UTR d'*AtSHR* ont été mis en évidence chez *A.thaliana* (Helariutta, Fukaki et al. 2000). Ces sites sont localisés différemment ce qui conduit à la formation de deux transcrits dans la plante. L'existence d'une régulation post-transcriptionnelle d'*AtSHR* a été confirmée par l'étude de Lee et al. qui a mis en évidence ce type de régulations pour différents facteurs de transcription chez *A.thaliana* (Lee, Colinas et al. 2006). De même pour *PtSHR*, pour qui six isoformes issues d'épissages alternatifs dans le domaine GRAS ont été identifiées (Jones 2011). Aucune régulation post-transcriptionnelle, que ce soit par épissage alternatif ou polyadénylation, n'a été mise en évidence pour les gènes *OsSHR1* et *OsSHR2* à l'heure actuelle, mais sachant que leurs spécificités se concentrent dans leur 3'UTR et que cette zone a été démontrée comme fortement impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes participant à des processus développementaux (Kuersten and Goodwin 2003), il est possible que ce mécanisme existe aussi chez le riz. Nous pourrions ainsi envisager plusieurs méthodes pour tester l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle. Nous pourrions dans un premier temps comparer les phénotypes et les transcriptomes des lignées surexprimeurs avec ou sans 3'UTR, et sous le contrôle d'un promoteur inductible. Ce dernier permettrait de s'affranchir des problèmes de régénération causée par la surexpression. Nous pourrions également envisager de réaliser une lignée transgénique présentant un système de double rapporteur avec le promoteur du gène *SHR1* ou *SHR2* fusionné à deux protéines rapportrices différentes, dont la première serait suivie d'une région 3'UTR contrôle et la seconde du 3'UTR du gène d'intérêt.

Comme tout facteur de transcription, *OsSHR1* et *OsSHR2* induisent de nombreuses cibles primaires et secondaires. En les identifiant nous pourrions ainsi connaître le réseau de gènes dans lequel ils interviennent, et avoir ainsi une meilleure idée de leur fonctionnement et de



leur mode d'action. Afin d'identifier les cibles de *SHR1* et *SHR2*, nous envisageons d'utiliser la méthode TARGET (Transient Assay Reporting Genome-wide Effects of Transcription factors) (Bargmann, Marshall-Colon et al. 2013) combinée à du RNAseq (Nagalakshmi, Waern et al. 2001). Cette méthode permet d'identifier les cibles de facteurs de transcription (FT) via un système d'expression transitoire dans des protoplastes. Les facteurs de transcription étudiés sont fusionnés à la protéine GR (récepteur des glucocorticoïdes), et transformés dans les protoplastes. En présence de son ligand la dexaméthasone, l'élément GR induit l'entrée du FT d'intérêt dans le noyau. L'absence ou la présence d'un traitement au cycloheximide (inhibiteur de traduction) des protoplastes transformés, permet d'identifier les cibles primaires des FT d'intérêt. Cette technique permettrait ainsi de distinguer les cibles primaires et secondaires des gènes *SHR1* et *SHR2*.

Nous avons présenté ici diverses techniques qui nous permettraient d'approfondir nos connaissances sur le fonctionnement des gènes *SHR* dans les racines de riz, mais il existe encore de nombreuses autres pistes à explorer, dont notamment le rôle de ces gènes dans l'architecture et la croissance foliaire. Ce rôle a déjà été mis en évidence chez le peuplier (Wang, Andersson-Gunneras et al. 2011), *A.thaliana* (Dhondt, Coppens et al. 2010) et le maïs (Slewinski, Anderson et al. 2012). Au cours de nos analyses, nous avons également mis en évidence que l'expression ectopique des gènes *SHR1* et *SHR2* du riz engendrait des perturbations dans l'organisation foliaire, résultant à un enroulement prononcé des feuilles. De plus, dans le contexte actuel de changement climatique qui nécessite de créer de nouvelles variétés plus adaptées aux conditions de sécheresse et plus économes en eau, de nouveaux projets cherchent à comprendre quels mécanismes et quels gènes diffèrent entre les plantes C3 et C4. Les plantes C4 sont connues pour avoir une photosynthèse plus efficace, grâce à un mécanisme de fixation du carbone différent de celui des plantes C3, qui repose sur la séparation spatiale de sa fixation et de son accumulation dans les cellules de la feuille. Les plantes C4 présentent une organisation différente des tissus internes, avec une disposition concentrique des cellules du mésophylle autour des cellules de la gaine, qui sont elles même plus nombreuses que chez les plantes C3 (Langdale, Lane et al. 1989). Des gènes clés tels que *SHR* et *SCR* ont été identifiés dans le contrôle de l'anatomie des plantes C4. En effet, les mutants perte de fonction de ces deux gènes chez le maïs présentent des perturbations au niveau de cette organisation, et plus particulièrement au niveau de la disposition des cellules de la gaine (Wysocka-Diller, Helariutta et al. 2000; Slewinski, Anderson et al. 2012; Slewinski, Anderson et al. 2014). Chez *A.thaliana*, *SHR* et *SCR* participent également à la spécification des cellules de la gaine, selon un mécanisme semblable à celui de la spécification de l'endoderme dans les racines, où *SHR* migre des tissus vasculaires à la couche adjacente formée par les cellules de la gaine, où elle active *SCR* (Gao, Wang et al. 2014). Ces gènes commencent à être utilisés dans des projets de conversion anatomique de plantes C3 en C4, tel que le « C4 project » de l'IRRI, qui consiste à appliquer cette stratégie sur le riz (<http://c4rice.irri.org/>). Cette conversion repose sur un réarrangement spatial des cellules de la feuille ainsi qu'à une modification d'expression de gènes impliqués dans la photosynthèse.



Pour conclure, l'analyse fonctionnelle comparée entre *SHR1* et *SHR2* a déjà permis d'amender le modèle proposé par Cui et al. (Cui, Levesque et al. 2007; Wu, Lee et al. 2014). Au-delà de cette étude, l'analyse de la fonction des gènes *SHR* de différentes espèces permettra de mieux comprendre la mise en place des tissus internes dans les racines et les feuilles, et donc de faire un lien entre l'évolution moléculaire des plantes terrestres et l'apparition de nouvelles fonctions.



# **Matériels et Méthodes**

# Matériels

## Kits

Le kit Nucleospin RNA d'extraction ARN provient de la compagnie Macherey-Nagel (Allemagne). Deux types d'enzymes de reverse transcription ont été utilisés : le kit M-MLV de la société Promega (EU) ainsi que le kit Super Script III cDNA First Strand synthesis de la compagnie Invitrogen (EU). Pour la qRT-PCR, le kit SYBR Green I de la société Roche (France) a été utilisé. Les PCR ont été réalisées avec les taq polymerases KOD Xtrem Hot Start et KOD Hot Start qui provenaient de la société Millipore (Allemagne). Diverses techniques de clonage ont été employées au laboratoire. Le système Gateway (vecteur intermédiaire pDONr) est proposé par la société Life Technology du groupe Thermo Fisher Scientific (EU). Le clonage des produits de PCR a été réalisé dans les vecteurs pCR-XL-TOPO de la société Invitrogen (EU) pour ensuite être transféré dans le vecteur final pCambia 5300 (Australie). Les enzymes de restriction utilisées pour ces clonages ont été achetées auprès de la compagnie New England Biolabs (NEB, Grande-Bretagne) qui fournit aussi les tampons correspondants. D'autres clonages ont été réalisés directement par la société Genscript (EU). Pour l'analyse par RNAseq des échantillons surexprimeurs, les banques de cDNA ont été réalisées à l'aide des produits fournis par la société Illumina (EU), puis séquencés sur la plateforme de Génome et Transcriptome (GeT) de Toulouse ([www.france-genomique.org](http://www.france-genomique.org)).

## Matériel végétal

### Plantules de 6 jours :

Toutes les expériences ont été réalisées sur des racines de la variété de riz sauvage Nipponbare (*Oryza sativa L. japonica*). Les graines sont dans un premier temps décortiquées manuellement à l'aide d'un décortiqueur. Elles sont par la suite stérilisées. Pour cela, elles sont désinfectées à l'éthanol 70% pendant 1 minute puis rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile. Elles sont ensuite stérilisées dans un bain d'eau de javel (v:v 20 :30) auquel sont ajoutées quelques gouttes de Tween 80 (Sigma-Aldrich P4780-500 mL) durant 30 minutes, avant d'être rincées au moins 4 fois avec de l'eau stérile. Les graines sont ensuite semées sur des boîtes de Pétri de 20x20cm (Corning 431301; 20 cm x 20 cm) contenant 200 ml de milieu MS/2. Les grains sont orientés embryons vers le bas, l'embryon sortant légèrement de l'agarose. Les boîtes de Pétri sont scellées avec du parafilm et disposées à la verticale dans la chambre d'acclimatation (12h de lumière par jour, 28°C/25°C jour/nuit, intensité lumineuse : 500  $\mu$ Em-2s-1, humidité relative de 55%), faisant un angle d'environ 40° avec le support.

### Plantes cultivées en hydroponie :

Après une pré-germination, les plantules de variété Nipponbare ont poussé dans un système d'hydroponie dans une chambre de culture en conditions contrôlées (12h de lumière par jour, 28°C/25°C jour/nuit, intensité lumineuse : 500  $\mu$ Em-2s-1, humidité relative de 55%). Le système d'hydroponie est constitué de 2 boîtes en plastique d'une contenance



de 60 litres. Chacune d'entre elles est remplie de 30 litres de solution CIRAD. Un tapis en mousse percé est ajouté au dispositif. Quatre-vingt trous sont réalisés sur chacun des tapis pour contenir les plantules. Une pompe est disposée au fond de la cuve pour homogénéiser la solution. La solution est maintenue à un pH de  $5.4 \pm 0.2$ , et changée toutes les 2 semaines.

## Cals

Les cals embryogènes étudiés sont obtenus par la mise en induction de grains. Selon les expériences menées, différents grains ont été utilisés. Les multiples transformations génétiques qui ont lieu au laboratoire ont été réalisées sur des grains *Nipponbare* mis en co-culture avec la souche EHA105 d'*Agrobacterium tumefaciens*. Pour l'étude de la régénération, trois types de cals ont été étudiés, provenant de la mise en induction de grains *Nipponbare* sauvage, de grains d'une lignée fixée homozygote contenant l'insert pUBI::GUS, et de grains de la lignée fixée homozygote pSHR1::GUS.

## Protoplastes

Les protoplastes utilisés ont été faits à partir d'explant de feuilles ou de pointes racinaires de plantules âgées de 7 jours selon le protocole de Zhang et al. (Zhang, Zhang et al. 2011).

# Méthodes

## Extraction des acides nucléiques

### Extraction ADN

Cent mg de feuilles sont aliquotés dans des tubes eppendorf de 2ml. Les échantillons sont lyophilisés toute une nuit à  $-80^{\circ}\text{C}$ , puis broyés après introduction de deux billes dans chaque tube à l'aide du broyeur (30 coups/s, 2 fois 1 min30). Après centrifugation des tubes 900µl de MATAB sont ajoutés pour resuspendre la poudre. Les tubes sont vortexés et incubés 45-60 minutes à  $72^{\circ}\text{C}$ . 900µl de CIAA sont ajoutés à chaque tube. Après une agitation par retournement, les tubes sont centrifugés (10 min 6000 rpm à température ambiante). La phase aqueuse est transvasée dans un nouveau tube auquel on ajoute 720µl d'isopropanol. Après une centrifugation (20minutes à 6200g) le surnageant est éliminé et 300µl d'éthanol 70% sont ajoutés. Les tubes sont de nouveau centrifugés (10 minutes à 6200 g) et les surnageant éliminés. Les tubes sont séchés durant 1h à  $37^{\circ}\text{C}$  puis re-suspendus toute une nuit dans 50 µl d'eau stérile. Les concentrations en ADN des échantillons sont calculées par le Nanoquant 200 Pro Tecan. La qualité des ADN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose.

## Extraction ARN

Les ARN totaux des échantillons (feuilles et ou racines) sont extraits par le kit nucleospin RNA de Macherey –Nagel selon le protocole fournit dans le kit. Les échantillons sont auparavant broyés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. La concentration et la qualité des ARN des échantillons sont calculées/évaluées par le Bionalalyzer Agilent 2100 ou le NanoDrop ND-1000 Spectro. La qualité des ARN est confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose.

## Analyse de l'expression des gènes

La synthèse de cDNA a été réalisée en utilisant le kit M-MLV (Promega) ou le kit Super Script III cDNA First Strand synthesis (Invitrogen). Entre 200 et 500ng d'ARN sont utilisé selon les extractions. Les proportions en eau RNase free, dNTP, reverse transcriptase et oligos dT ont été incorporées selon les indications présentes dans les protocoles des kits respectifs.

L'expression des gènes a été analysée à partir de ces ADNc par qRT-PCR et RT-PCR pour les gènes pour lesquels nous n'avons pas pu trouver d'oligonucléotides spécifiques utilisables en qRT-PCR.

Les qRT-PCR sont réalisées sur le système LightCycler 480 (Roche). Chaque échantillon contient 4µl SYBR Green Mater Mix (Roche), 0.8µl de primers Reverse et Forward (à 10 µM), 2 µl de cDNA dans un volume final de 10µl. Le programme d'amplification est le suivant : dénaturation de 5min à 95°C ; amplification (20 sec 95°C, 15 sec 60°C, 20 sec 72°C) avec 45 cycles ; courbe de fusion de 5 sec à 95°C et 1min 65°C puis un refroidissement de 30 min à 40°C. Deux répétitions sont réalisées pour chaque gène étudié. Le niveau d'expression du gène de référence EXP' (*Os06g11070*) a été utilisé pour normaliser les niveaux d'expression des gènes cibles. La quantification relative de l'expression des gènes est calculée selon le modèle décrit dans (Souaze, Ntodou-Thome et al. 1996). Les primers utilisés ont une efficacité entre 1.8 et 2.2 et sont décrits dans le **Tableau 1**.

Les PCR semi-quantitatives ont été réalisées avec les taq KOD Hot Start (pour le gène At4g37650) et la KOD Xtrem Hot Start (pour les gènes Os07g39820 et Os03g31880). Les analyses ont été menées en suivant les protocoles des fournisseurs, avec des primers spécifiques à chacun des gènes décrits dans le **Tableau 1**. La qualité et l'expression des gènes ont été évaluées sur par électrophorèse sur gel d'agarose. Tous les échantillons ont été extraits et rétrotranscrits en même temps afin de limiter les biais. Un contrôle de la RT-PCR a été effectué avec un couple de primers témoin appelé Exp' (primers pour un gène stable dans le riz). Un contrôle négatif « eau » a également été réalisé.

**Tableau 1 : Primers utilisés**

<b>Primers RT-PCR</b>	<b>séquences</b>
SH 106 RT-PCR_AtSHR_1_FWD	CACGTGGAAGCCCTAGAGAC
SH 107 RT-PCR_AtSHR_1_REV	CCATCGACCAAACACCTTCT
SH 110 RT_PCR_SHR1_FWD	TCGAGTCCTTCCTGGAGGT
SH 111 RT_PCR_SHR1_REV	TACGCCGAGAAGAAGCGCAA
SH 113 RT_PCR_SHR2_REV1	CGCCGAGAAGAAGCGGAG
SH 114 RT_PCR_SHR2_FWD2	CTCCTCGTCGTCCTTCATCGT
EXP FWD	CGGTTAGCTAGAGTTCATGTGAGA
EXP REV	ATTGGAGTAGTGGAGTGCCAAA
<b>Primers qRT-PCR</b>	
SH 3_SHR1_FWD	TAAGCTAGCAAGCTCTCTCGTG
SH 4_SHR1_REV	ACCTACATGCCTTTGTGTGAG
SH 11_SHR2_FWD	GCGTGACGTACTTAGGGTTTTTC
SH 12_SHR2_REV	TGTGTTTTGCTACCTCCTCTCC
SH 130_qPCR_AtSHR_FWD	GTTTTCCAAGGACGAGCAAC
SH 131_qPCR_AtSHR_REV	CACAAGCCACAAGATCAACG
EXP FWD	CGGTTAGCTAGAGTTCATGTGAGA
EXP REV	ATTGGAGTAGTGGAGTGCCAAA
<b>Primers TILLING</b>	
SH 37 403336 FWD	GCCGGACCTCAACCTCGACT
SH 46 403336 REV	GCAGCGAGTTGACGCAGTTG
<b>Primers clonage</b>	
pSHR2_HindIII_FWD	ATAAGCTTATAGCTGGCCATACTAACTTGCT
pSHR2_XbaI_REV	ATTCTAGACTAGACCTAAGACACCTGCAGT
CDS_OsSHR2_FWD	ATTCTAGACTTCTTCATTTCAACCCCTTG
CDS_OsSHR2_REV	ATGGATCCCTAGACCTAAGACACCTGCAGTAGTAG
RNAi_SHR1_FWD	AAAAAAGCAGGCTGCTGTTTAGGTTGGTTAGCCTCCA
RNAi_SHR1_REV	AAGAAAGCTGGGTCGCTGTTGCTGCTGTGGTGGT
RNAi_SHR2_FWD	AAAAAAGCAGGCTGACCAGCCGCACAAGTCGTA
RNAi_SHR2_REV	AAGAAAGCTGGGTCGCCTCCACCACCCTGGTAAT

## Banque RNAseq

Dans un premier temps les ARN sont extraits selon le protocole décrit précédemment. Ils sont dosés avec le Bioanalyzer Agilent 2100. Seuls les ARN de très bonne qualité sont utilisés pour la banque (RIN >7.5) et en quantité suffisante (>250ng/μl). La banque RNAseq a été construite selon le protocole expérimental fourni par Illumina, basé sur les étapes suivantes : purification et fragmentation des ARNm, synthèse des ADNc double brins, réparation des extrémités, adénylation des extrémités 3', ligation des adaptateurs et amplification par PCR. Avant le séquençage la qualité des échantillons est vérifiée par un nouveau dosage au Bioanalyzer Agilent 2100 avec les puces Agilent DNA 7500. Le séquençage est réalisé sur un séquenceur Illumina HiSeq2500 sur la plateforme Génome et Transcriptome (GeT) de Toulouse.

Les alignements des reads sur le génome du riz ont été réalisés par le bioinformaticien Gaëtan Droc. Une analyse qualitative a été menée sur l'ensemble des données : un ratio entre le nombre de reads des échantillons de la classe A sur d'échantillon de la classe B pour une même lignée a été calculé. Avant de procéder au calcul des ratios, il a fallu effectuer un nettoyage des données :

- Suppression des gènes ne présentant aucun reads pour aucun des deux phénotypes.
- Suppression des gènes pour lesquels une différence inférieure à 30 reads entre les deux phénotypes.
- calcul du ratio reads phénotype classe A/ reads phénotype classe B

Nous avons considéré un gène comme régulé si ce différentiel d'expression était supérieur à 3 ou inférieurs à 0,3. Une liste des gènes activés et inhibés est réalisée pour chaque lignée, et sert de données pour la réalisation de diagrammes de Venn, réalisés grâce au site internet <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Les diagrammes représentant les voies métaboliques empruntés par les gènes régulés et les diagrammes illustrant les facteurs de transcription représentés par ces gènes sont réalisés à partir du logiciel Mapman (<http://mapman.gabipd.org>).

## Analyses protéiques

### Western Blot

#### Extraction des protéines :

Entre 200 et 500 mg de tissus foliaire sont broyés dans l'azote liquide puis homogénéisés dans 1 mL de tampon d'extraction (**Tableau 12**). L'homogénat est centrifugé 15 min à 15 000 tr/min à 4°C. Il peut être nécessaire de réaliser une seconde centrifugation de 5 min dans les mêmes conditions pour obtenir un surnageant dépourvu de débris. Le surnageant est aliquoté et immédiatement placé à -20°C. Un des aliquots est utilisé pour doser les protéines totales extraites selon la méthode de Bradford et réaliser le western.

#### Séparation des protéines sur gel d'acrylamide

Environ 50 µg de protéines totales solubles sont déposés sur un gel d'acrylamide 8%, 1,5mm (système midget). Dans le dépôt : 45µl de protéines + 5µl de tampon de charge 10X (**Tableau 12**). Dénaturation de 2 minutes à 100°C (bain sec) avant le dépôt sur gel. La migration est de 2 heures selon le programme suivant : 50mA constant voltage 300V, kWh au maximum.

#### Transfert des protéines sur la membrane :

La membrane imbibée de méthanol est déposée sur le gel de migration. De part et d'autre sont disposés une éponge et du papier whatmann tous les deux imbibés de tampon de transfert. Le transfert s'effectue à 4°C (dans la glace) durant 1h30 à 80V.

#### Blocage de la membrane :

La membrane est disposée dans une boîte cristal contenant du BSA 10%, sous agitation pendant 1heure à température ambiante.

**Premier anticorps :**

L'incubation se fait dans le PBS-tween 0,2% à température ambiante sous agitation durant 1h. 20ml d'anticorps (à dilution variable selon la nature de l'anticorps) est appliqué sur les membranes dans les boîtes cristal.

**Second anticorps :**

Après trois rinçages de 5 min dans le plus grand volume possible de PBS-Tween 0,2% à température ambiante sous agitation, l'incubation avec le deuxième anticorps se fait dans les mêmes conditions que pour le premier avec une dilution variable selon le type d'anticorps secondaire (1/500 à 1/1000) durant au moins 30 minutes sous agitation à température ambiante. La membrane est ensuite rincée successivement deux fois avec du PBS-Tween 0,2%, et une fois avec du PBS 1X.

**Révélation :**

Les anticorps utilisés au laboratoire sont couplés à un fluorochrome. Après un rinçage et séchage de la membrane, 4ml d'Immobilion (Millipore) (v:v) est appliqué pendant 5 minutes.

**Immunolocalisation :****Anticorps pariétaux**

Les coupes radiales sont réalisées comme le protocole décrit précédemment dans la partie phénotypage racinaire et rincées une première fois durant 10 minutes avec de la glycine 0.1 M complétée à du PBS 1X. Puis les coupes radiales sont rincées deux fois 10 minutes au PBS1X. Ensuite les coupes sont disposées dans des lames à chambre (Lab-Tek 177402 sur lesquelles est ajouté 150 µl de Blocking Buffer 4% sous agitation toute une nuit à 4°C. L'anticorps primaire dilué 1/10 est appliqué sur les coupes sous agitation toute une nuit à 4°C. Avant l'application de l'anticorps secondaire, les coupes sont rincées trois fois au PBS 1X. L'anticorps secondaire est couplé à un fluorochrome (Alexa 561 anti-rat ou Alexa 561 anti-mouse) et dilué 500 fois dans le Blocking Buffer. Les coupes sont incubées deux heures en présence de l'anticorps secondaire sous agitation à température ambiante avant d'être rincées trois fois au PBS1X pendant 10 minutes puis montées entre lame et lamelle. Une fois montée il est nécessaire de sécher la lame au moins 36 heures à 4°C à l'obscurité.

Les lames sont observées au microscope confocal Zeiss LSM 510 ou le microscope confocal Leica SP8 aux grossissements 20x et 40x pour les lignées surexprimeurs, 40x pour les séminales et 60x pour les latérales. Les parois cellulaires sont visualisées grâce à leur autofluorescence (720 nm avec le laser chaméléon ou à 405nm). L'anticorps secondaire est visualisé avec une excitation autour de 550nm (laser Helium Neon à 543nm ou laser 561nm).

### Anticorps spécifiques

Les immunolocalisations des anticorps spécifiques ont été réalisées par l'entreprise Histalim sur des échantillons fixés de racines de lignées surexpresseurs et des racines des plantes contrôle (vecteur vide).

Les anticorps OsSHR1 & OsSHR2 ont été synthétisés par Eurogentec (France) dont les séquences sont visibles dans le **Tableau 2** et l'anticorps AtSHR a été fourni par l'équipe de Malcom Bennet (université de Nottingham).

**Tableau 2 : séquence peptidiques des anticorps spécifiques**

Nom Anticorps	Séquence peptidique	Taille peptide
OsSHR1	YYLEPYQEECGNAPHH	16 AA
OsSHR2	CSPPDQPHKSYPSRG	16 AA

Le protocole se résume aux étapes suivantes :

- Déparaffinage
- Démasquage
- Incubation Anticorps I
- Incubation Anticorps II (linker utilisé pour les immunolocalisation SHR1 et AtSHR)
- Incubation multimère
- Révélation DAB
- Contre coloration Hématoxyline (coloration des noyaux)
- Post contre coloration Bluing Reagent (solution de lithium carbonate) augmente le contraste de l'hématoxyline)

### Colorations

#### Coloration FASGA

La coloration est réalisée sur des coupes fraîches d'agarose. Avant l'incubation dans la coloration FASGA une décoloration de 30 à 60 secondes dans de l'hypochlorite de sodium (NaClO) à 12% est nécessaire, suivie de 3 rinçages de 1 minute dans de l'acide acétique 5% (CH<sub>3</sub>COOH). L'incubation dans la solution FASGA est faite sur 12h (toute une nuit) à température ambiante, à l'obscurité, sous agitation. Il est ensuite nécessaire de rincer deux à trois les coupes à l'eau distillée. Le dernier rinçage s'effectue 12 h sous agitation à température ambiante.

#### Coloration au X-Gluc :

Les échantillons sont préfixés dans de l'acétone 90% à -20°C pendant 30 minutes, puis rincés 2 à 3 fois à l'eau distillée. Ajout du tampon GUS, et infiltration sous vide pendant 15 minutes (casser le vide régulièrement). Les échantillons sont ensuite incubés avec la solution X-Gluc pendant toute une nuit à 37°C. Le tampon GUS est ensuite retiré et les échantillons

rincés plusieurs fois à l'eau distillée. Une décoloration à l'éthanol 70% peut s'avérer nécessaire pour mieux voir le signal GUS dans les parties aériennes.

## Clonages

### Fusions traductionnelles

Le promoteur du gène *OsSHR1* a été sous cloné dans un vecteur pCAMBIA5300 dans lequel a été inséré préalablement la protéine GFP et un terminateur tNOS. Les gènes *SHR1*, *SHR2*, *AtSHR* sans les codons stop ont été insérés en phase avec la GFP en utilisant un site *EcoRI*. Le même linker que celui décrit dans (Wu, Lee et al. 2014) a été inséré entre la séquence de la protéine d'intérêt et la protéine rapportrice GFP.

### Lignées RNAi :

Les ARNdb sont synthétisés à partir d'une PCR sur l'ADN génomique en ajoutant les sites de clonage à l'extrémité des primers. Ces ARN db ont été clonés dans le vecteur intermédiaire pDonR par une réaction Gateway BP, puis dans le vecteur final pBios738 par une réaction Gateway LR.

### CRISPR/Cas9 :

Les sgRNA ont été introduits dans le vecteur pH-Ubi-cas9 par clonage golden gate, avec l'utilisation d'une enzyme de restriction de type II *BsaI*. Les sgRNA sous contrôle du promoteur de riz nucléaire U3 sont sous-clonés dans un vecteur binaire contenant la CAS9 codon optimisée pour le riz sous le contrôle du promoteur de l'ubiquitine de maïs (Miao, Guo et al. 2013).

## Transformation du riz

### Induction des grains :

Les grains sont dans un premier temps désinfectés comme décrit précédemment (Matériel végétal, plantule à 6 jours) puis transférés à l'aide d'une spatule dans une boîte de pétri (Optilux 100 x 20cm) contenant le milieu d'induction NB, à raison de 12 grains par boîte. Les boîtes de culture sont mises en incubation à l'obscurité à 28°C pendant 20 jours. Les scutellum des embryons ont formé des cals primaires de diamètre 0.5 à 1 cm, qui sont transférés sur du milieu NB (boîtes Optilux 100 x 15cm) à raison de 30-50 par boîte. Les boîtes sont remises à l'obscurité à 28°C pendant 10 jours.

### Transformation des cals :

Quatre jours avant le jour de la co-culture, les Agrobactéries (*agrobacterium tumefaciens* de la souche EHA105 sont transformées par électroporation puis sont ensemencées dans 50 ml de milieu liquide LB contenant les antibiotiques appropriés à 28°C pendant une nuit. 200µl de cette culture servent à ensemercer une boîte de milieu AB,

incubée pendant 3 jours à 28°C. Les bactéries sont ensuite collectées et transférées dans 30 ml de milieu R2-CL, dont la densité optique (DO) est ajustée à 1. Vingt-cinq ml de cette suspension sont transférés dans la boîte de Petri contenant une cinquantaine de cals sélectionnés (entre 3 et 5 mm de diamètre, de forme sphérique, de couleur jaune pâle) pendant 10 minutes. Les cals sont ensuite séchés et disposés à raison de 10 par boîte sur le milieu de co-culture R2-CS pendant 3 jours à l'obscurité à 25°C.

### **Sélection des cals résistants :**

A l'issue de ces 3 jours les cals sont transférés sur le milieu de sélection R2-CS sur lequel ils resteront 2 semaines à l'obscurité à 28°C. Les cals co-cultivés sont alors transférés sur un deuxième milieu de sélection NBS et placés à l'obscurité à 28°C. Après une semaine, les boîtes sont ouvertes pour ré-oxygéner les cals. Les proliférations résistantes formées sont étalées tout autour du cal cocultivé d'origine au contact du milieu sélectif. Les boîtes sont ensuite remises en incubation dans les mêmes conditions.

### **Régénération des cals :**

Les cals résistants sont transférés sur le milieu de pré-régénération P-RN boîtes Optilux (100 x 15cm) et mis en incubation à l'obscurité à 28°C pendant 7 jours. Durant cette semaine les cals vont grossir et devenir opaque. Les cals s'étant développés sont ensuite transférés sur le milieu de régénération RN en boîtes Optilux (100 x 15cm) à raison de 7 par boîtes. Ils sont dans un premier temps conservés 2 jours à l'obscurité à 28°C puis transférés en chambre de culture sous lumière continue (intensité lumineuse : 500 $\mu$ Em-2s-1) à 28°C. Après 3 semaines de culture, les cals verdissent et développent des tiges.

### **Développement des plantes transgéniques :**

Les cals régénérants sont transférés dans des tubes à essai en verre contenant 25ml du milieu d'enracinement MS. Les cultures sont alors conservées dans les mêmes conditions durant 3 à 4 semaines au cours desquelles se développent les plantes transformées.

## **Test antibiotique**

Vingt grains par lignée étudiée sont stérilisés selon le protocole décrit précédemment (Plantule 6 jours) et disposés dans une boîte de Pétri stérile (Optilux 100\*20cm) contenant du papier Whatmann stérile et 5ml de milieu MS/2 liquide. Les boîtes de Pétri sont scellées avec du parafilm et disposées dans la chambre d'acclimatation (12h de lumière par jour, 28°C/25°C jour/nuit, intensité lumineuse : 500 $\mu$ Em-2s-1, humidité relative de 55%) pendant 3 jours. Après germination, les plantules sont transférées dans de nouvelles boîtes de Pétri (optilux 100\*20cm) dans lesquelles sont ajoutés du papier Whatmann stérile et 5ml de milieu MS/2 liquide contenant de l'hygromycine à 50mg/l. les boîtes sont remise dans les chambres d'acclimatation dans les mêmes conditions pendant 2 à 3 jours. Après ces 3 jours les plantules résistantes ont poussé et sont restées vertes tandis que les plantes non transformées meurent en présence de l'antibiotique.



## Phénotypage racinaire des lignées TILLING

Un suivi quotidien de la croissance foliaire et racinaire a été effectué sur trois individus Ho et leurs SN pour chacune des lignées TILLING. Pour chaque analyse, 10 graines de chaque individu homozygote (soit 30 individus par mutation) ont été semées en même temps que leurs contrôles (SN et Nipponbare). Après 6 jours de croissance sur plaque, les plantules sont prélevées et les racines fixées afin d'être analysées. Les pointes racinaires sont coupées radialement au vibratome (Epaisseur des coupes 60µm, vitesse 30, fréquence 70, amplitude 0,7).

### Analyse de croissance :

Les grains sont semés selon le protocole décrit dans la partie Matériel Végétal. Les croissances de la partie aérienne et de la racine séminale sont suivies tous les jours après la germination. Pour l'analyse des lignées TILLING 30 individus par lignées sont étudiés (WT et homozygote). Les données sont ensuite analysées par un script sous R, qui calcule les moyennes de chaque échantillon pour chaque critère décrits dans le **Tableau 3**.

**Tableau 3 : critères évalués pour l'analyse de croissance des plantules**

Longueur Feuille 2 jour 1	Longueur Feuille 2 jour 2	Longueur Feuille 2 jour 3	Longueur Feuille 2 jour 4	Longueur Feuille 2 jour 5	Longueur Feuille 2 jour 6	Longueur Feuille 3 jour 6	Longueur séminale jour 1	Longueur séminale jour 2	Longueur séminale jour 3	Longueur séminale jour 4	Longueur séminale jour 5	Longueur séminale jour 6
---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------

### Analyse des coupes radiales :

Les racines sont récoltées après 6 jours de croissance dans la chambre d'acclimatation (16h de de lumière par jour, 500 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 28°C/25°C jour/nuit). Les racines sont sectionnées avec des ciseaux stériles à 2 cm au-dessus de l'apex et alignées au niveau des pointes racinaires par groupe de 3 à 8 racines. Les groupes de racines sont recouvert d'agarose liquide concentré à 3% (en utilisant une pipette de 1 ml). Une fois l'agarose contenant les racines alignées est légèrement durci, il est prélevé à l'aide d'une pince puis introduit dans un puit contenant de l'agarose 3% chaud (50°C). Après solidification (30 à 40 minutes), les blocs d'agarose contenant les racines sont coupés au vibratome Hm650v (Epaisseur des coupes 60µm, vitesse 30, fréquence 70, amplitude 0,7) à 0.5 cm au-dessus de l'apex. Les coupes sont placées sur lame de verre et observées au microscope Leica DM4500 au grossissement 40x. L'autofluorescence des parois cellulaires des cellules est visible dans les UV et permet une analyse fine des paramètres racinaires décrits dans le tableau 3. Les photos des coupes radiales sont acquises avec le filtre « A » par la caméra Retiga 2000R (QIMAGING, Canada) sous le logiciel Volocity (improvision, GB).

Les paramètres étudiés décrits dans le **Tableau 4** sont comparés entre les lignées grâce à des tests statistiques : test d'analyse de variance ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple (test de Newman et Keuls), avec un seuil de significativité de 1%. Les analyses sont faites à partir du logiciel SAS.

**Tableau 4 : critères anatomiques analysés pour les coupes radiales de racines**

Nombre de FCV	Diamètre de la racine	Nombre de couches de cortex	Nombre de cellules d'endoderme	Nombre de cellule d'inner cortex	Nombre de divisions anticlinales de l'endoderme	Nombre de divisions periclinales de l'endoderme	Nombre de divisions anticlinales du cortex 1	Nombre de divisions periclinales du cortex 1
---------------	-----------------------	-----------------------------	--------------------------------	----------------------------------	---	---	--	--

## Milieux de culture, solutions, tampons

**Tableau 5 : Milieu MS/2**

composants	Concentration
Agarose type II (sigma)	8g/l
milieu Murashige & Skoog (Dushefa)	2.15g/l
vitamines Murashige & Skoog (Dushefa)	75mg/l
Eau distillée	1l

**Tableau 6 : Milieux de culture**

Nom du milieu	composants	Concentration
<b>LB</b>	Bacto-tryptone	10g/l
	Bacto yeast extract	5g/l
	NaCl	10g/l
	Eau distillée	1l
<b>AB</b>	Difco bacto Agar	15g/l
	glucose	5g/l
	<b>Tampon AB</b> : $K_2HPO_4$	60g/l
	$NaH_2PO_4$	20g/l
	Eau distillée	50ml
	<b>Sels AB</b> : $NH_4Cl$	20g/l
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	6g/l
	KCL	3g/l
	$CaCl_2$	0.20g/l
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	50mg/l
	Eau distillée	50ml
	Eau distillée	900ml

## Milieux de transformation du riz :

Tableau 7 : milieux de transformation

Nom du milieu	composants	Concentration
<b>NB-Basic</b>	N6 Macro FeNaEDTA B5 Vitamins B5 Micro Myo-inositol Proline Glutamine Hydrolysate de caseine	50 ml/L 10 ml/L 10 ml/L 1 ml/L 100 mg/l 500 mg/l 500 mg/l 300 mg/l
<b>R2-Basic</b>	R2 Macro I R2 Macro II R2 FeNaEDTA R2 Micro R2 Vitamins	100 ml/L 100 ml/L 10 ml/L 1ml/L 25 ml/L
<b>NB (pH=5.2)</b> Induction des cals Multiplication des cals	NB Basic + Saccharose 2,4-D Phytigel	30 g/l 2.5 g/l 7 g/l
<b>R2-CL (pH=5.2)</b> Co-culture liquide	R2 basic+ <b>Glucose</b> <b>2,4-D</b> <b>Acétosyringone</b>	10 g/l 2.5 g/l 100µM
<b>R2-CS (pH=5.2)</b> Co-culture solide	R2-CL + Phytigel	7g/l
<b>R2S (pH=5.8)</b> Selection I	R2 Basic + Saccharose 2,4-D Phytigel Céfotaxime Vancomycine Hygromycine	30 g/l 2.5 g/l 7/l 400 mg/l 100 mg/l 50 mg/l
<b>NBS (pH=5.8)</b> Selection II	NB Basic + Saccharose 2,4-D Phytigel Céfotaxime Vancomycine	30 g/l 2.5 g/l 7/l 400 mg/l 100 mg/l

	Hygromycine	50 mg/l
<b>P-RN (pH=5.8)</b> <b>Pré-régénération</b>	NB Basic + Saccharose Phytigel Céfotaxime Vancomycine Hygromycine ABA BAP ANA	30 g/l 7/l 400 mg/l 100 mg/l 50 mg/l 5 mg/l 2 mg/l 1 mg/l
<b>RN (pH=5.8)</b> <b>régénération</b>	NB Basic + Saccharose Phytigel BAP ANA	30 g/l 4/l 1 mg/l 1 mg/l
<b>MS (pH=5.8)</b> <b>enracinement</b>	MS Vitamine MS Saccharose Phytigel	4.3g/l 103mg/l 50g/l 2.6g/l

**Tableau 8 : Milieu de culture hydroponie (solution CIRAD)**

Solutions	Sels	Poids moléculaire	Solution mère (g/L)	Concentration Solution mère	Volume pour 20 L
<b>NH<sub>4</sub>+Mg</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	132,14 246,49	33 197,2	250 mM 800 mM	40 mL
<b>Ca+K</b>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O KNO <sub>3</sub>	236,15 101,11	141,7 35,4	600 mM 350 mM	40 mL
<b>FeEDTA</b>	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> EDTA	278 372,24	5,56 7,44	20 mM 20 mM	60 mL
<b>Oligo-éléments</b>	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	169,02 1235,6 287,54 249,68 61,83	1,7 0,2 0,2 0,2 1,4	10 mM 0,16 mM 0,7 mM 0,8 mM 22,6 mM	40 mL
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	27,2	200 mM	80 mL

**Tableau 9 : Solutions pour immunolocalisation**

Nom du milieu	composants	Concentration
<b>PBS 10x (pH=7.4)</b> Tampon	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.94g/l
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.6g/l
	NaCl	70.128g/l
	KCl	2g/l
	Eau DEPC	1l
<b>PFA 4%</b> Solution de fixation	Paraformaldéhyde	10g
	NaOH 10N	50µl
	PBS 10X	25ml
	Eau bi distillée	200ml
<b>Blocking Buffer 10%</b>	Bovine Serum Albumine	10mg
	PBS1X	1ml

**Tableau 10 : Tampon GUS**

Nom du milieu	composants	Concentration
<b>X-GLUC 50mM</b>	DMSO	500ml
	X-Gluc	12.5mg
<b>X-GLUC Ferri Ferro</b>	Ferri 100mM	500µl
	Ferro 100mM	500µl
	Triton 10%	1ml
	XGluc 50mM	50ml

**Tableau 11 : Solutions d'histologie**

Nom du milieu	composants	Concentration
<b>Safranine 1%</b>	Safranine	1g
	Acétate de sodium	1g
	Formaldéhyde	2ml
	Ethanol absolu	75ml
	Eau distillée	25ml
<b>Bleu alcian 0.5%</b>	Bleu Alcian 8GX	0.5g
	Ethanol absolu	10ml
<b>Solution mère FASGA</b>	Safranine 1%	2ml
	Bleu alcian 0.5%	14ml
	Acide acétique	1ml
	Glycérine	30ml
	Eau distillée	19.5ml

**Tableau 12 : Tampons pour Western Blot**

<b>Nom du milieu</b>	<b>composants</b>	<b>Concentration</b>
<b>Tampon d'extraction de protéines</b>	Tris-HCl 1M pH=8 EDTA 0.5M Triton X-100 Glycérol DTT 1M Eau PMSF	50mM 1mM 0.1% 5% 1mM  1mM
<b>Tampon de Charge</b>	Tris-base pH=6.8 1M Glycerol 100% SDS 20% B-mercaptoethanol Bleu de bromophenol eau	1.5ml 1.6ml 2ml 1ml 0.5ml 1.4ml
<b>Tampon de migration TGS 10x</b>	Tris-base pH=6.8 1M Glycine SDS 20% eau	30.3g 144.1g 5ml 1l
<b>Tampon de transfert</b>	Tris-base pH=6.8 1M Glycine SDS 20% methanol	30.28g 144g 10ml 20%

**Tableau 13 : Solution pour extraction ADN**

<b>Nom du milieu</b>	<b>composants</b>	<b>Concentration</b>
<b>MATAB</b>	Tris-HCl 1M pH=8 EDTA 0.5M NaCl 5M pH=8 Glycérol MATAB (Mixed Alkylmetrik Ammonium Bromide) Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> PEG 6000 Eau distillée	50ml 20ml 140ml 75ml 25ml 10g 2.5g 5g 500ml
<b>CIAA</b>	Chloroforme Isoamyl alcool	480ml 20ml
<b>Tris EDTA</b>	Tris-HCl 1M pH=8 EDTA 0.5M Eau distillée	2ml 400µl 200ml



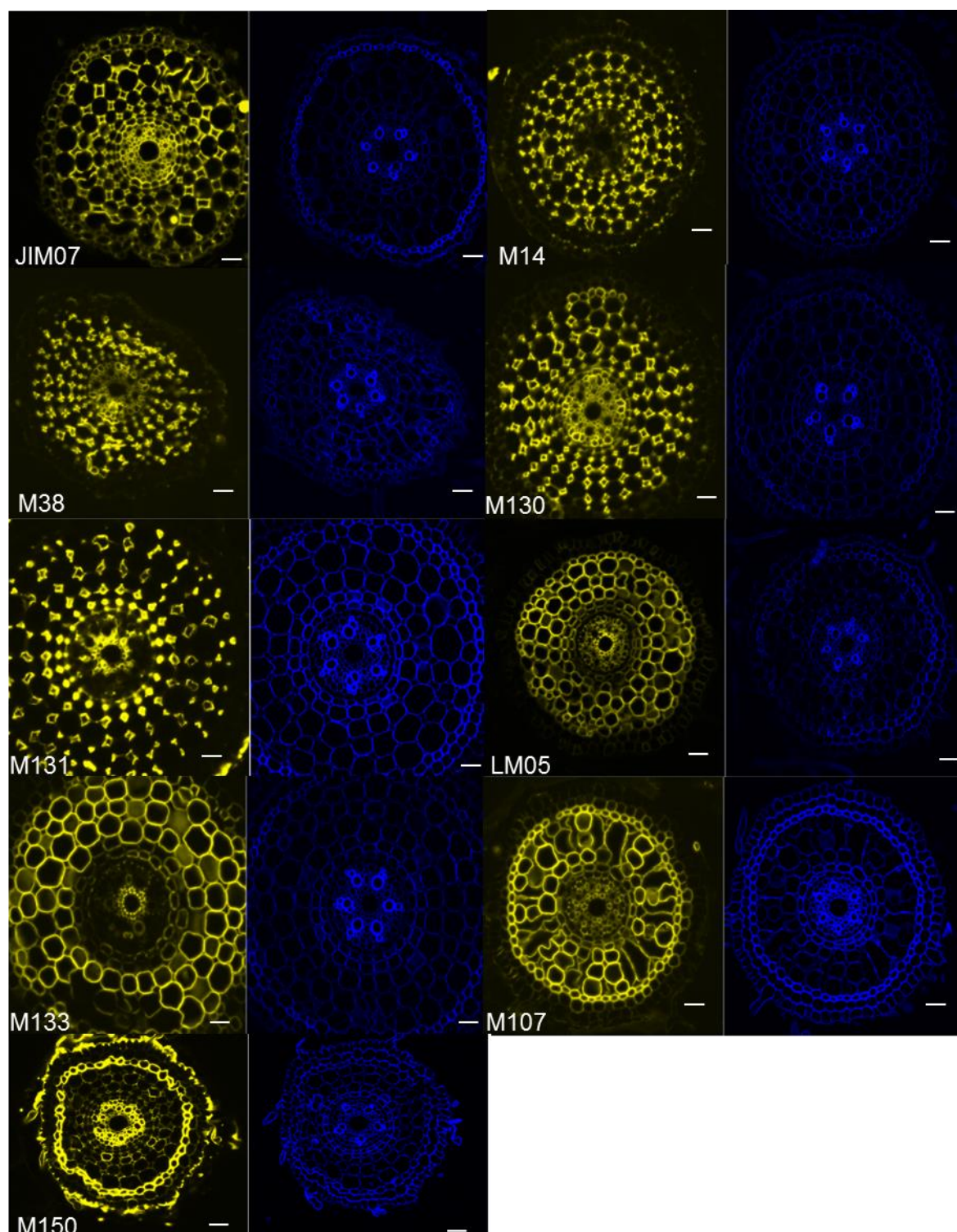




# **Annexes**

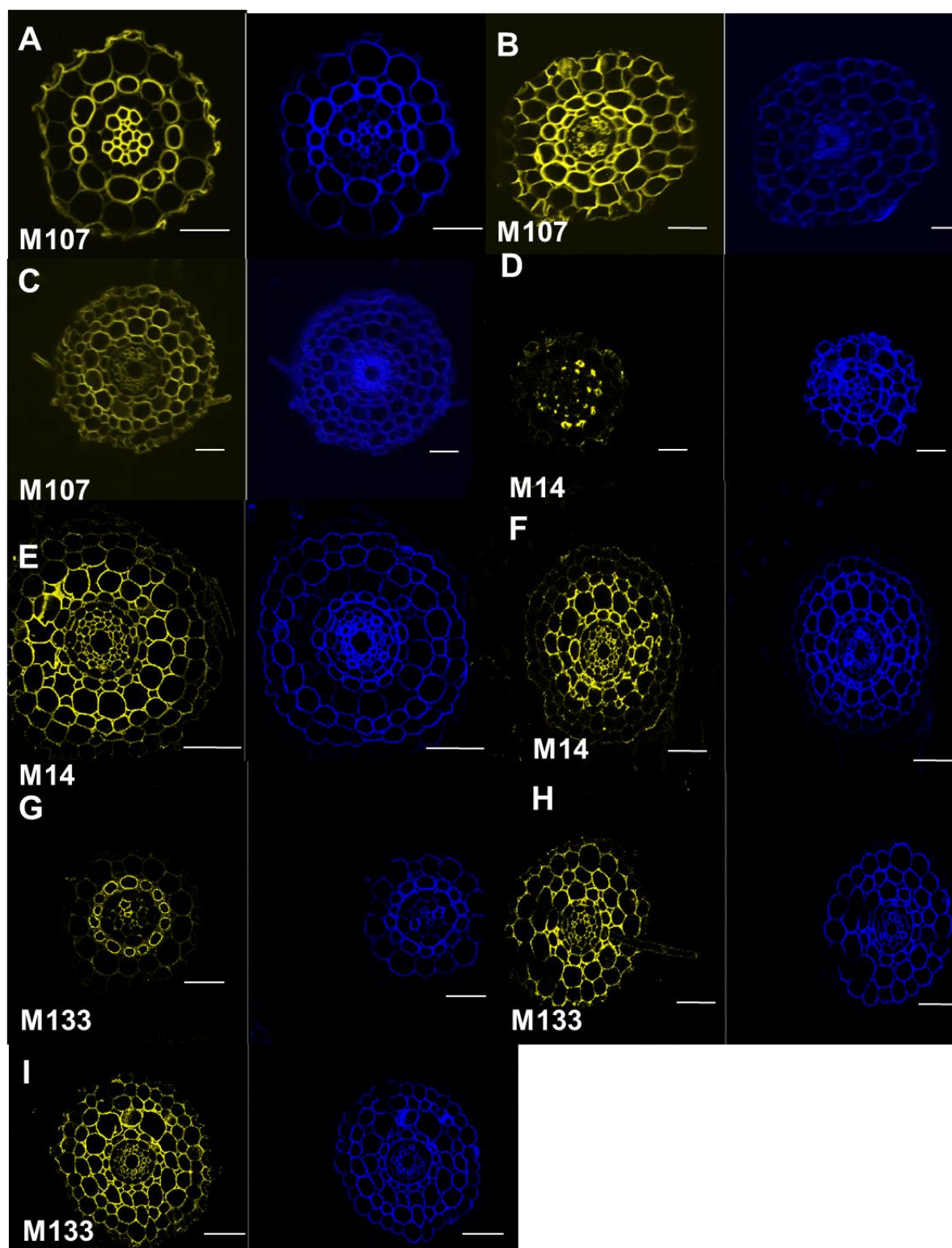
**Annexe 1 : Split des immunolocalisation des huit anticorps spécifiques du cortex sur des coupes radiales de racine séminale âgée de 6 jours**

En bleu figure l'autofluorescence des parois et en jaune le marquage des anticorps.



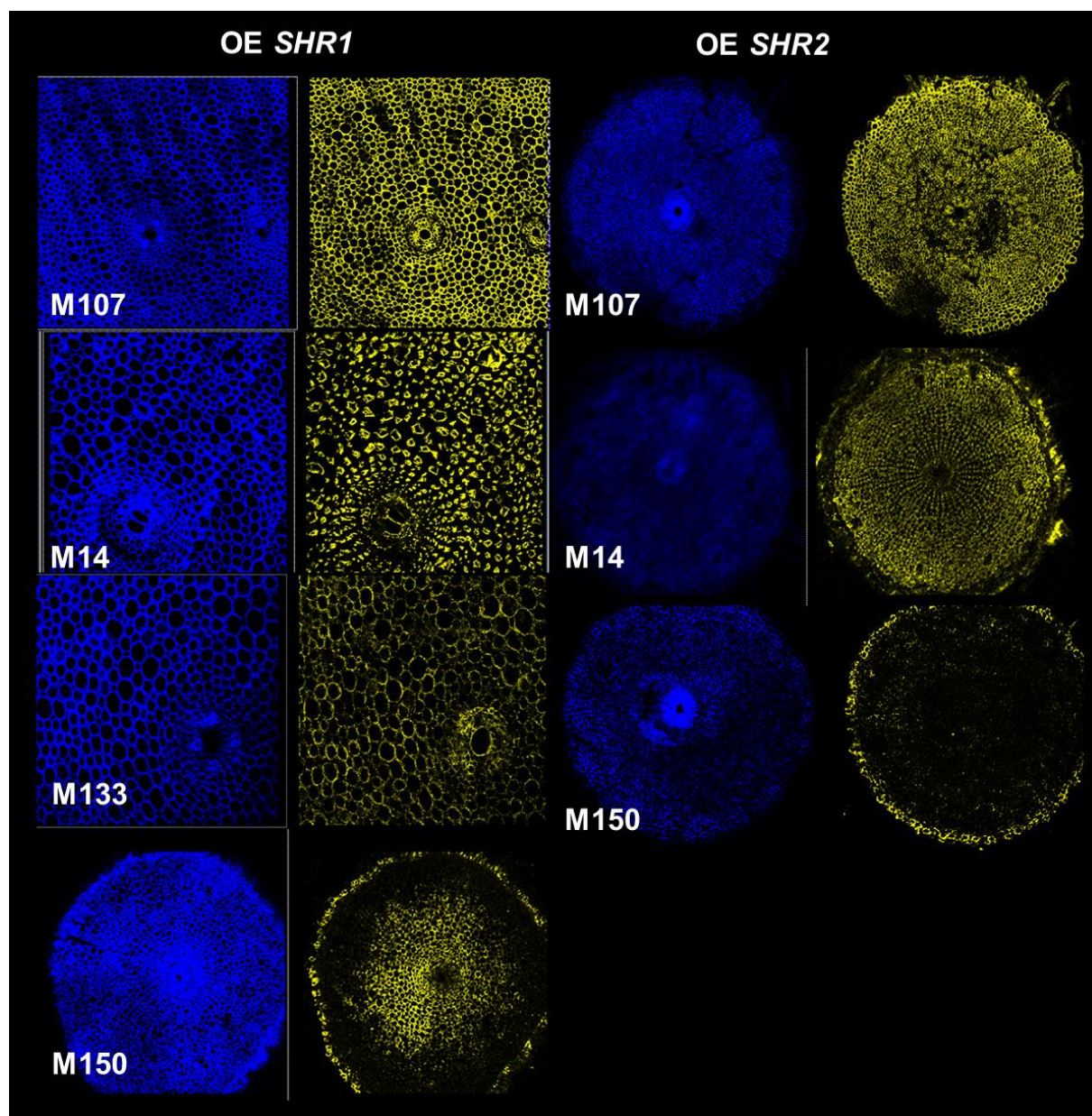
**Annexe 2 : Split des immunolocalisation des huit anticorps spécifiques du cortex sur les trois types de racines latérales : SLR, T-LLR et L-LLR**

En bleu figure l'autofluorescence des parois et en jaune le marquage des anticorps.

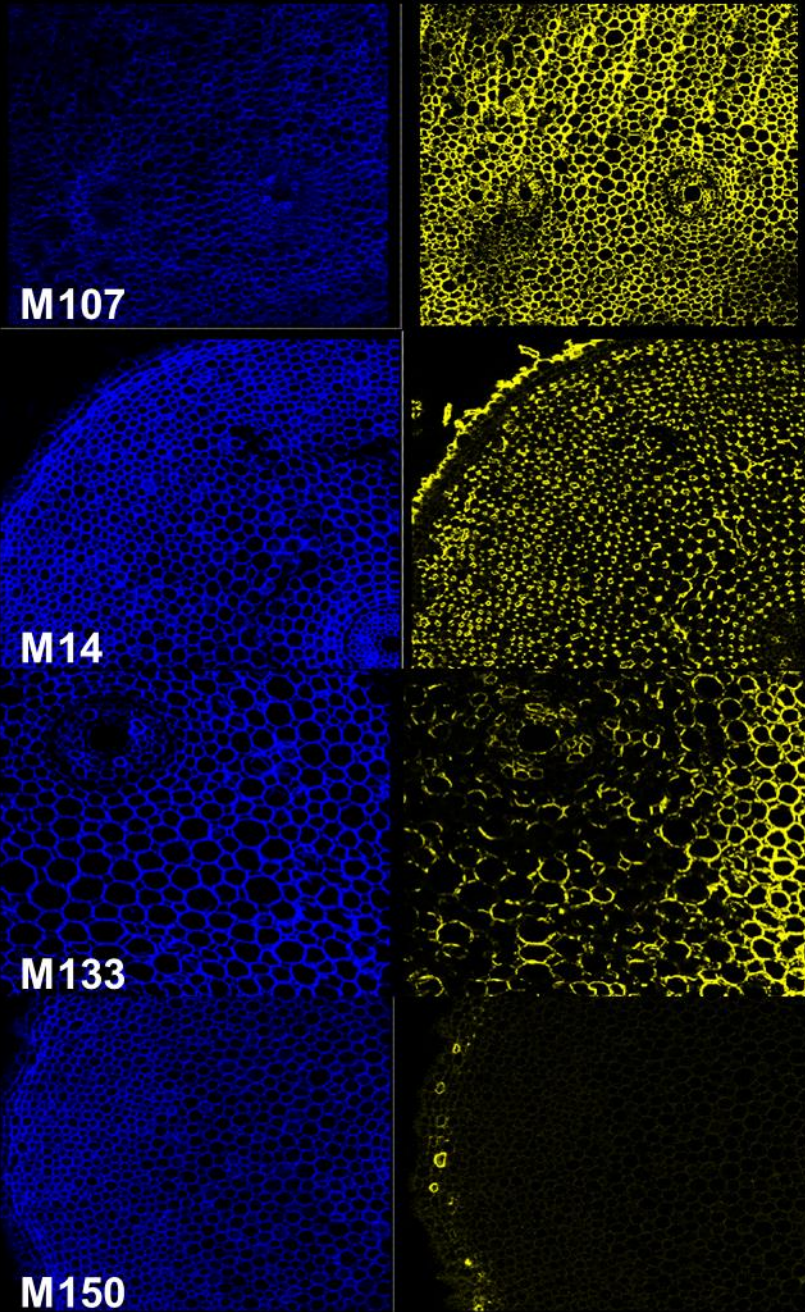




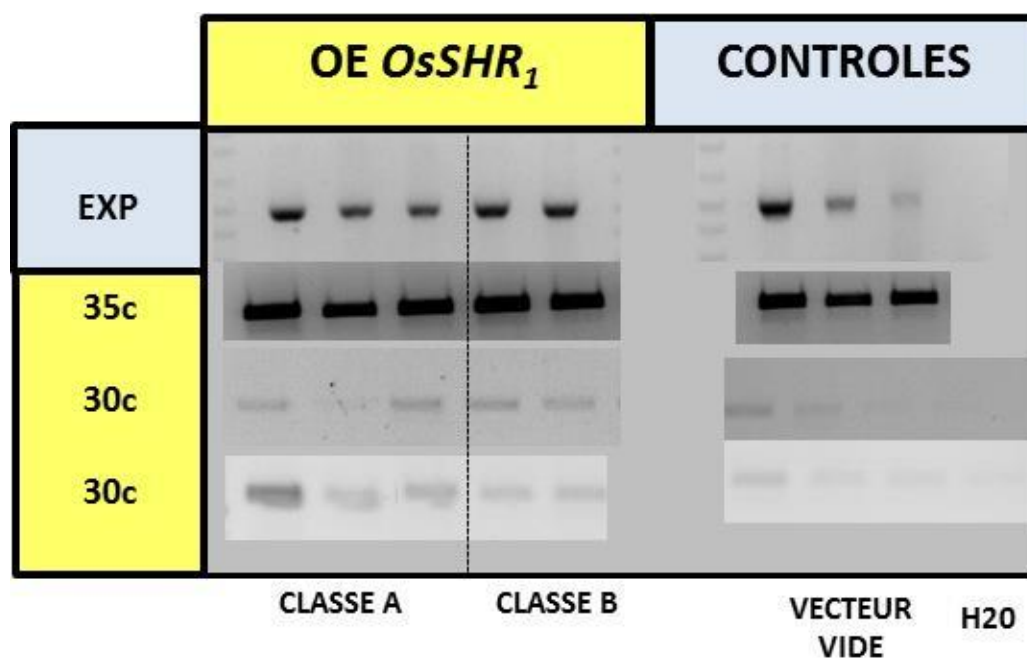
**Annexe 3: Split des immunolocalisation des quatre anticorps spécifiques sur les racines latérales des lignées OE *SHR***



**OE *AtSHR***

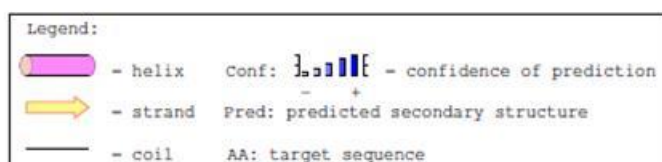
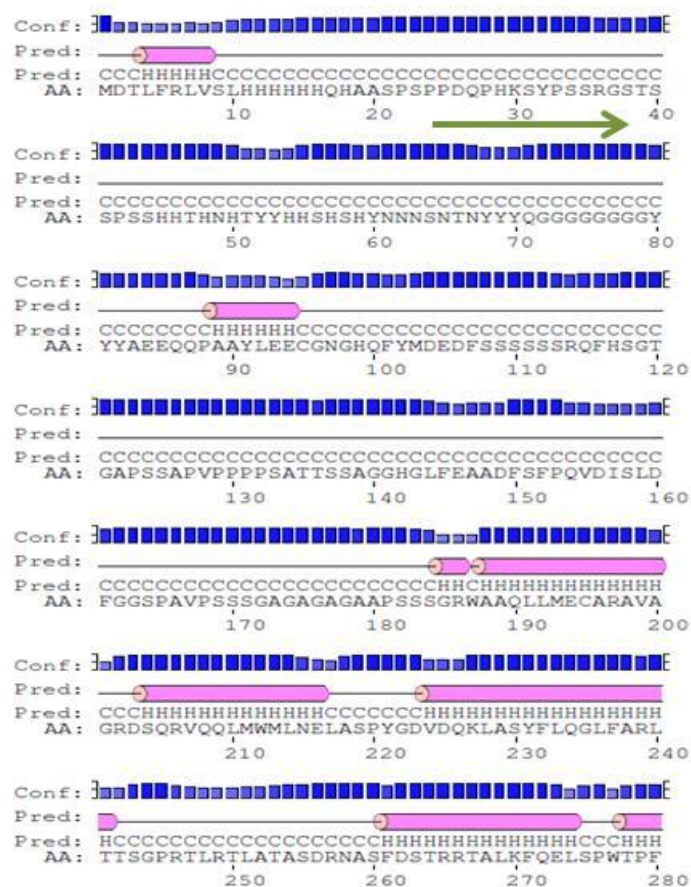
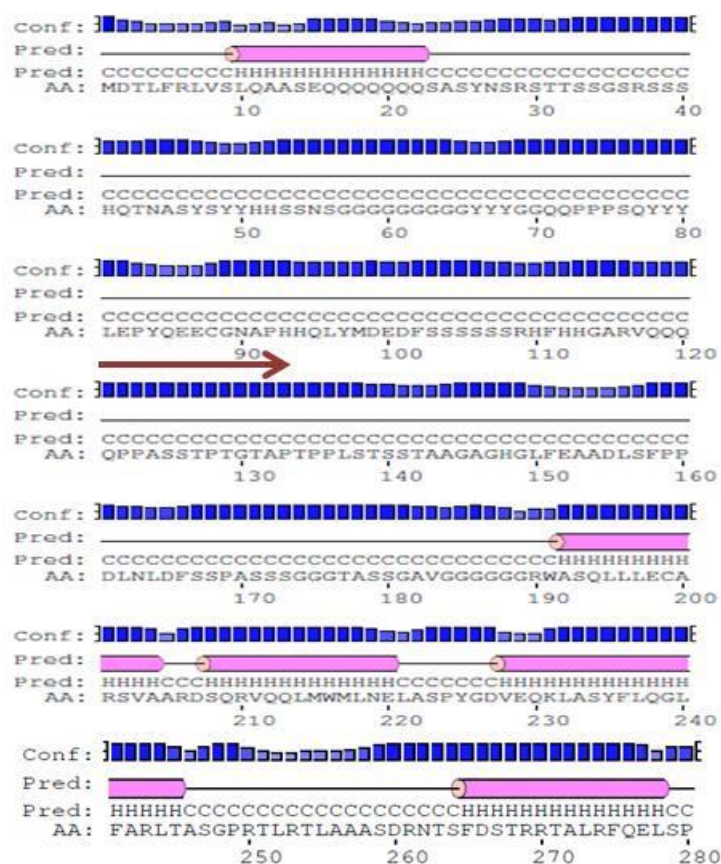


Annexe 4 : Rt-PCR sur la lignée OE *SHR1*, avec un problème de répétabilité des PCR.

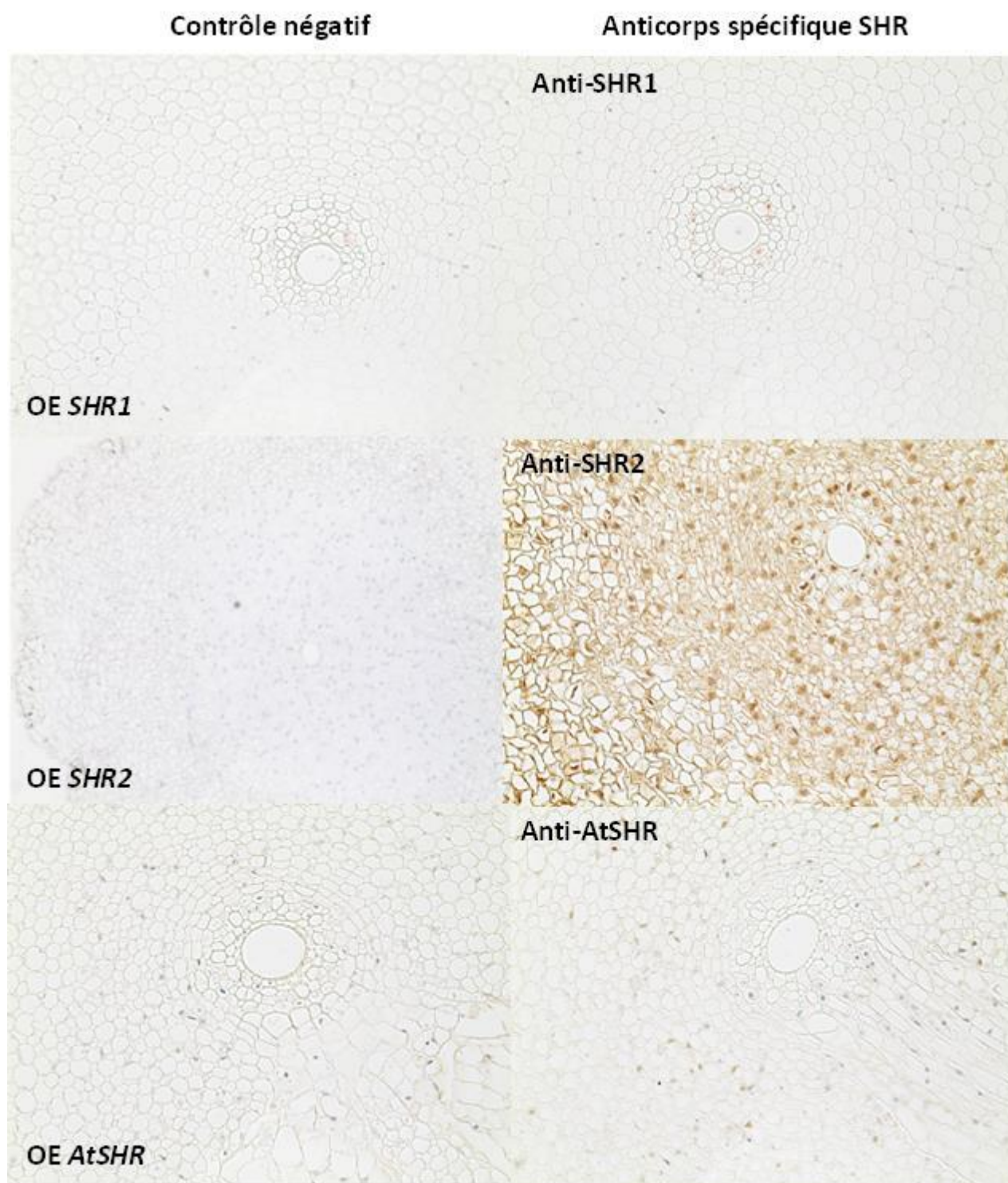




**Annexe 5 : Repliements des protéines SHR1 (à gauche) & SHR2 (à droite). Les anticorps sont illustrés par des flèches.**



**Annexe 6 : immunolocalisation des lignées OE *SHR* avec les anticorps spécifiques *SHR***



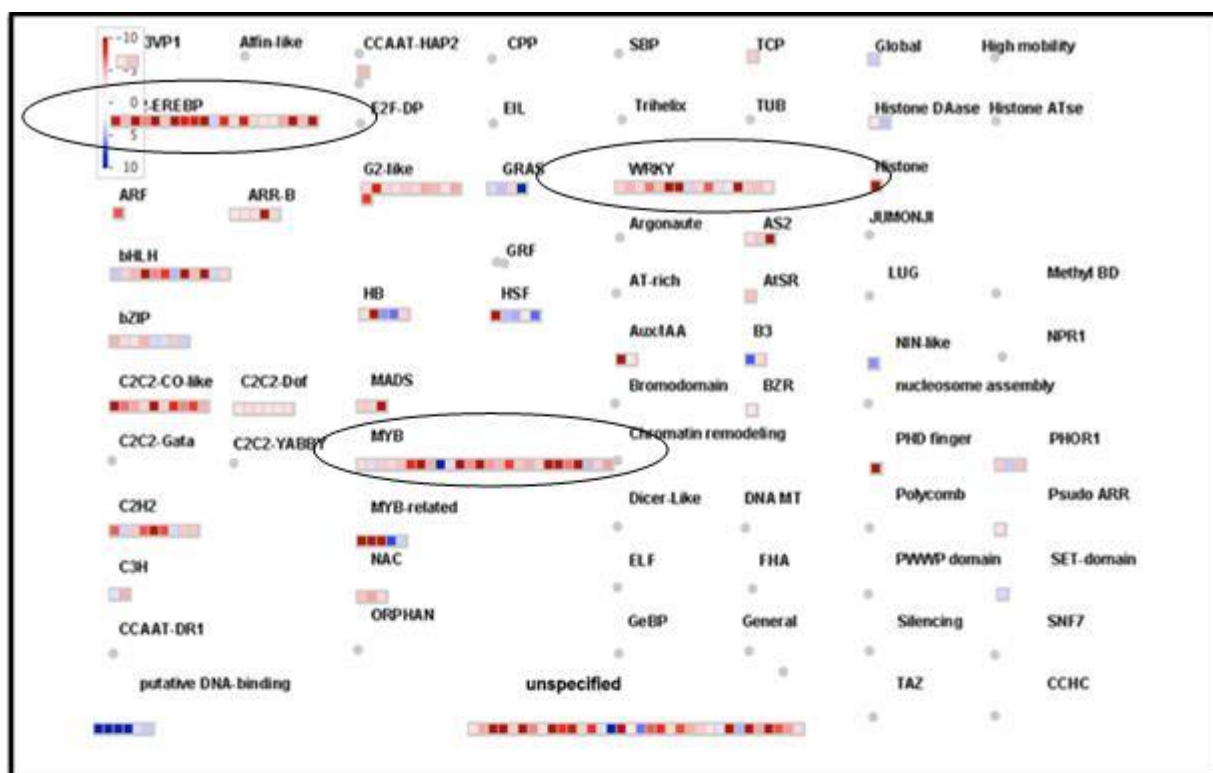


## Annexe 7 : Données RNAseq : Nombre de reads par échantillon,

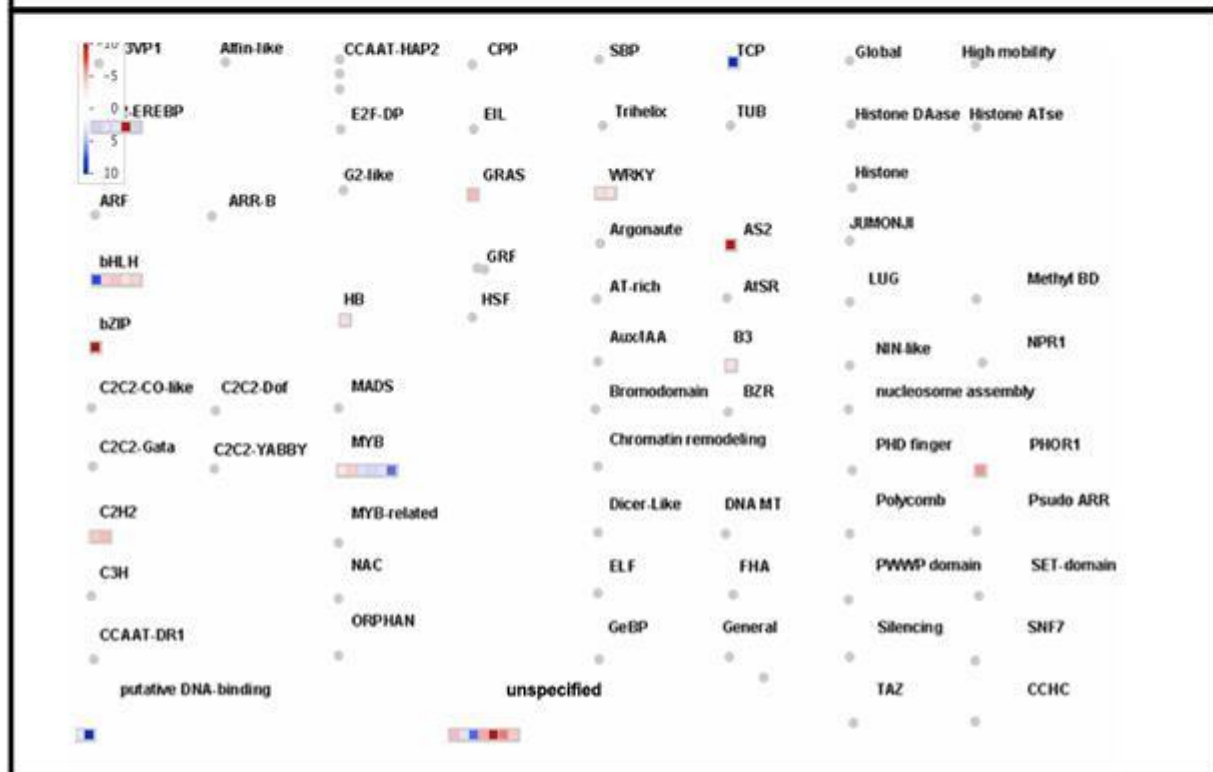
	accession	Nom des gènes	READS CLASSE B OE <i>AtSHR</i>	READS CLASSE A OE <i>AtSHR</i>	READS CLASSE B OE <i>SHR1</i>	READS CLASSE A OE <i>SHR2</i>	READS CLASSE B OE <i>SHR2</i>	READS CLASSE A OE <i>SHR2</i>
gènes de ménage	Os07g27870	thioesterase family protein, putative, expressed	739	744	671	762	1071	1019
	Os12g38970	VIP4, putative, expressed	1733	1890	2050	1713	2729	1882
	Os03g01160	protein kinase family protein, putative, expressed	1023	2351	749	711	1375	1491
	Os06g11070	expressed protein EXP'	754	933	508	758	516	610
gènes SHR	Os07g39820	OsSHR1	1137	1219	1022	840	722	344
	Os03g31880	OsSHR2	671	458	434	174	901	41463
	At4g37650	AtSHR	1	99	0	0	0	0
cibles SCR	Os11g03110	SCARECROW 1, GRAS family transcription factor domain containing protein, expressed	386	505	326	367	341	968
	Os12g02870	SCARECROW 2, GRAS family transcription factor domain containing protein, expressed	428	500	326	505	347	1219

**Annexe 8 : Diagramme représentant les familles de transcriptions régulées dans les lignées OE *SHR2* et OE *AtSHR*.** Les familles de FT impliquées dans les processus développementaux sont activées chez les OE *SHR2* (entourées en noir)

OE *SHR2*

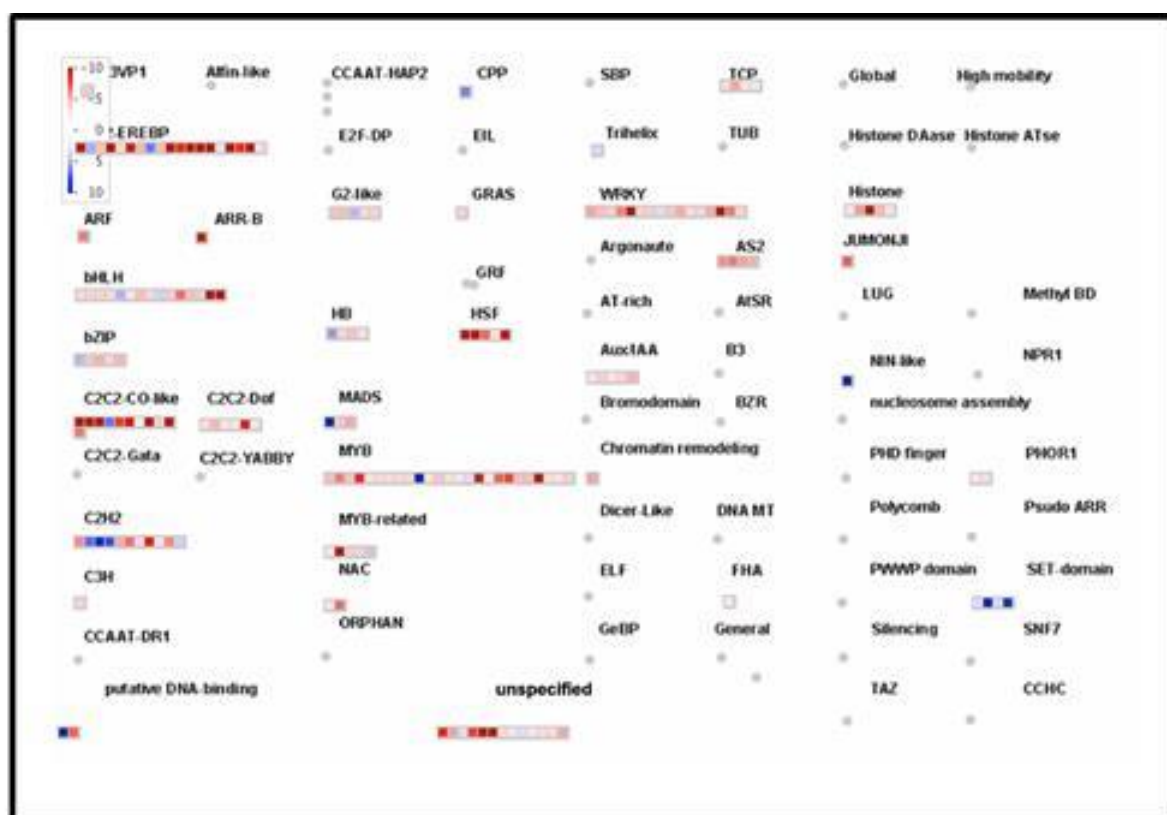


OE *AtSHR*



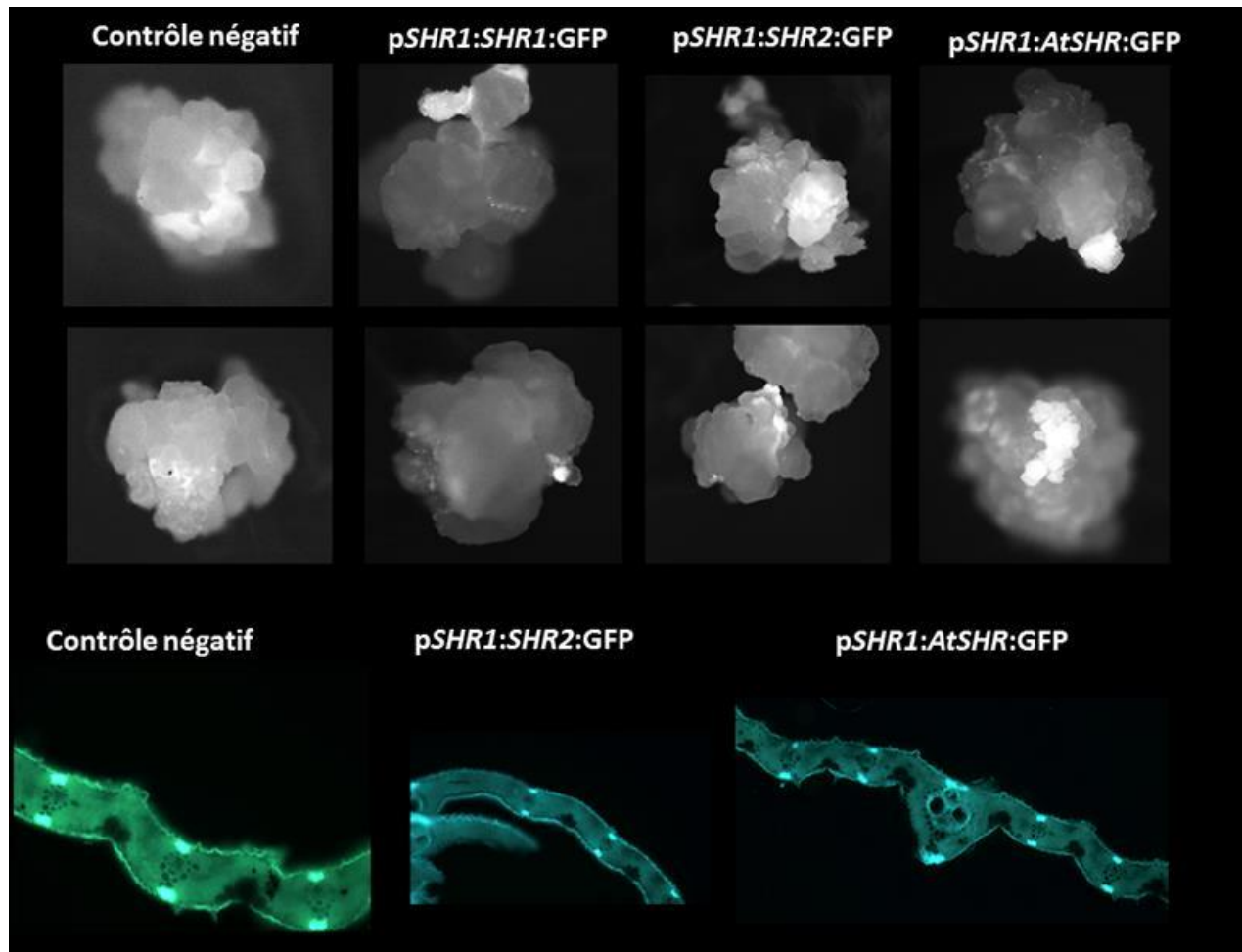
Annexe 9 : Diagramme représentant les familles de transcriptions dérégulées dans la lignée OE *SHR1*. Les profils sont semblables à la lignée OE *SHR2*.

OE *SHR1*



**Annexe 10 : observation du signal GFP des fusions traductionnelles au stade cal (sous loupe binoculaire) et au stade plante en serre (sous microscope optique).**

Les signaux perçus chez les lignées transformées existent aussi chez la lignée contrôle et correspondent probablement à de l'autofluorescence.



## Annexe 11 : Zone de désordre structurel dans la protéine OsSHR1

(<http://mobidb.bio.unipd.it/entries/Q8H2X8>)



## Annexe 12 : Alignement des protéines SHR

Les leucines de ce motif sont conservées chez le riz en position 398 et 401 pour SHR1 et 402 et 405 pour SHR2 (en rose) dans le domaine conservé LNDELV (en jaune), et la thréonine responsable de la mobilité de la protéine en position 344 pour SHR1 et 351 pour SHR2 (en vert).

```
OsSHR1  MDTLFLRLVSLQ-----AASEQQQQQQSASYNRSTTSSGSRSSSHQTN---ASYSY  50
OsSHR2  MDTLFLRLVSLHHHHHHQHAASPSPDPQPHKSYPPSRGSTSSPSSHHTNHTYYHHSHSHY  60
AtSHR   MDTLFLRLVSLQ-----QQQQSDSIITNQSSLRTSTTTTGSPQ----TAYHY  43

OsSHR1  HHSSNS----GGGGGGGGGGYYGGQPPPSQYYYLEPYQEECGNAPHHQLYMDDEFSSSS  106
OsSHR2  NNNSNTNYYYQGGGGGGGGYYAAEQQP-----AAYLEECGNG--HQFYMDDEFSSSS  111
AtSHR   NFPQND-----VVEEC-----FNFMDEEDLSSS  67

OsSHR1  SSRHFHHGARVQQQPPASSTPTGTAPTPLSTSTAAGAGHGLFEAADLSFPP-DLNLD  165
OsSHR2  SSRQFHS-----TGAPS-SAPVPPPSATSSAGGHGLFEAADFSFPQVDISLD  160
AtSHR   SSHNNHN-----HNNPNTYYSPFTTPTQYHPATSTPSSTAAAAALASPYSSSG  117

OsSHR1  FS-SPASSSSGGGTASSGAVGGGGGGRWASQLLLECARVAARDSQRVQQLMWMLNELASP  224
OsSHR2  FGGSPAVPSSSGAGAGAGAAPSSSGRWAAQLLMECARAVAGRDSQRVQQLMWMLNELASP  220
AtSHR   HHNDPSAFSIPQTPPSFDFSAN--AKWADSVLLEAARAFSDKDTARAQQLWTLNELSSP  175

OsSHR1  YGDVEQKLASYFLQGLFARLTASGPRTLRLTLAAAS--DRNTSFDSTRRTALRFQELSPWS  282
OsSHR2  YGDVDQKLASYFLQGLFARLTTSGPRTLRLTLATAS--DRNASFDSTRRTALKFQELSPWT  278
AtSHR   YGDTEQKLASYFLQALFNMTGSGERCYRTMVTAAATEKTCSEFSTRKTVLKFQEVSPWA  235

OsSHR1  SFGHVAANGAILESFLVAAA-----ASSETQRFHILDLSNTFCTQWPTLLEAL  331
OsSHR2  PFGHVAANGAILESFLAAAAGAAASSSSSSSTPTRLHILDLSNTFCTQWPTLLEAL  338
AtSHR   TFGHVAANGAILE-----AVDGEAKIHIVDISSTFCTQWPTLLEAL  276

OsSHR1  ATRSADETPHLSITTVVSAAP-SAPTAAVQRMREIGQRMKEKFARLMGVPFPRFRAVHHSG  390
OsSHR2  ATRSSDDTPHLSITTVVPTA---APSAAAQRMREIGQRLKFKARLMGVPFPRFRAVHHSG  395
AtSHR   ATRS-DDTPHLRLITTVVVANKFVNDQTASHRMMKEIGNRMEKFARLMGVPFKFNIHHVG  335

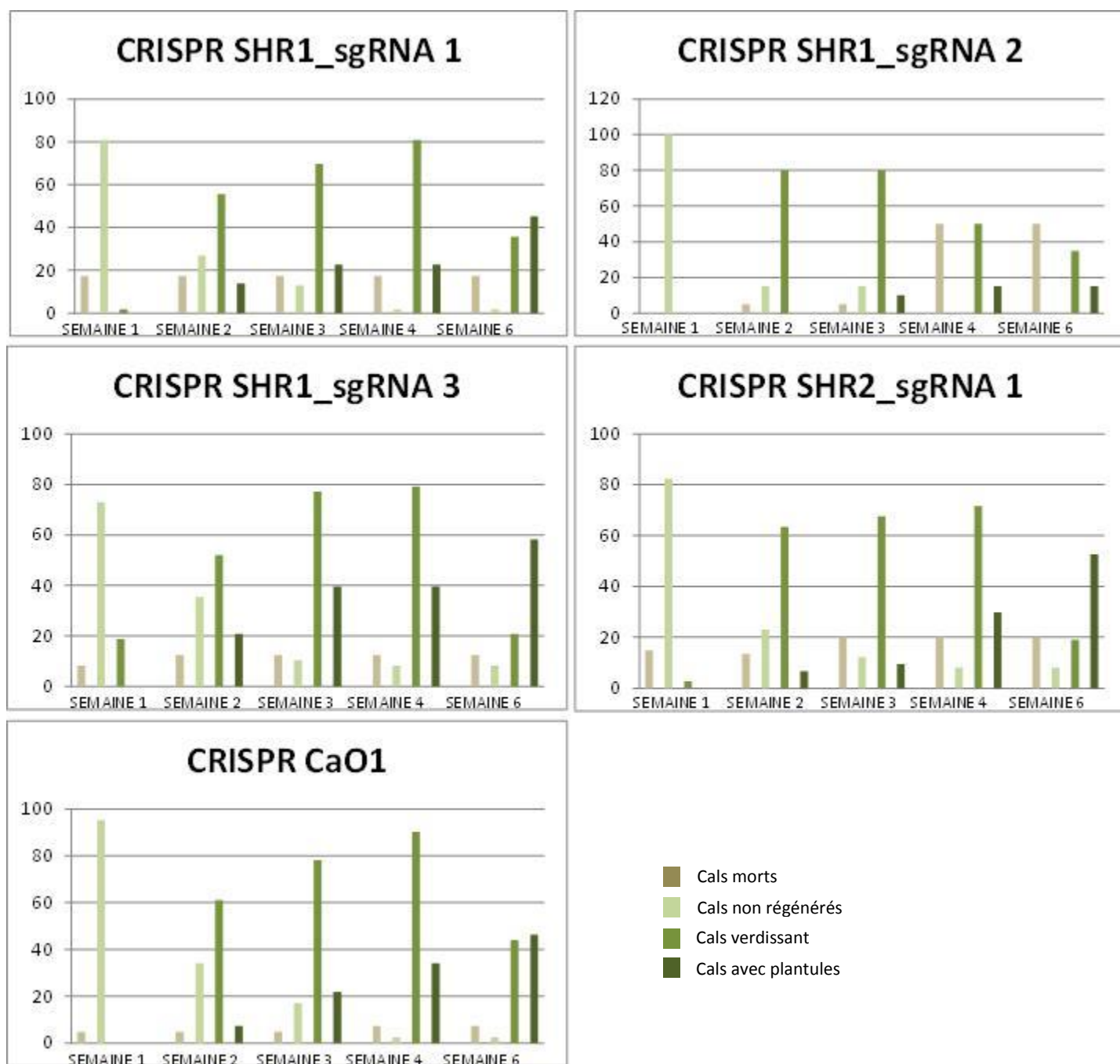
OsSHR1  DLAELDLDDLREGGATTALAVNCVNSLRGVVPGRRRRDAFAASLRRLDPRVVTVVVEE  450
OsSHR2  DLADLDLDDLREGGATAALAVNCVNALRGVARG---RDADFVASLRRLPRVVTVVVEE  451
AtSHR   DLSEFDLNELDVK---PDEVLAINECVGAMHGIASRGSP-RDAVISSFRRLRPRIVTVVEE  391

OsSHR1  EADLVASDPDASSATEEGDTEAAFLKVFGEGLRFFSAYMDSLEESFPKTSNERLALERG  510
OsSHR2  EADLAAPEADASSEA----DTDAAFVKVFGEGLRFFSAYMDSLEESFPKTSNERLSLERA  507
AtSHR   EADLVGEEE-----GGFDDEFLRGFGECLRWFRVCFESWEESFPRTSNERLMLERA  442

OsSHR1  AGRAIVDLVSCPASESMERRETAASWARRMRSAGFSPVAFSEDVADDVRSLLRRYREG-W  569
OsSHR2  VGRAIVDLVSCPASQAERRETAASWARRMRSAGFSPAAFSEDVADDVRSLLRRYKEG-W  566
AtSHR   AGRAIVDLVACEPSDSTERRETARKWSRRMRNSGFGAVGYSDEVADDVRALLRRYKEGVW  502

OsSHR1  SMREAG--TDDSA--AGAGVFLAWKEQPLVWASAWRP-  602
OsSHR2  SMRDAGGATDDAAGAAAAGAFLAWKEQPVVWASAWKP-  603
AtSHR   SMVQCF-----DAAGIFLCWRDQPVVWASAWRPT  531
```

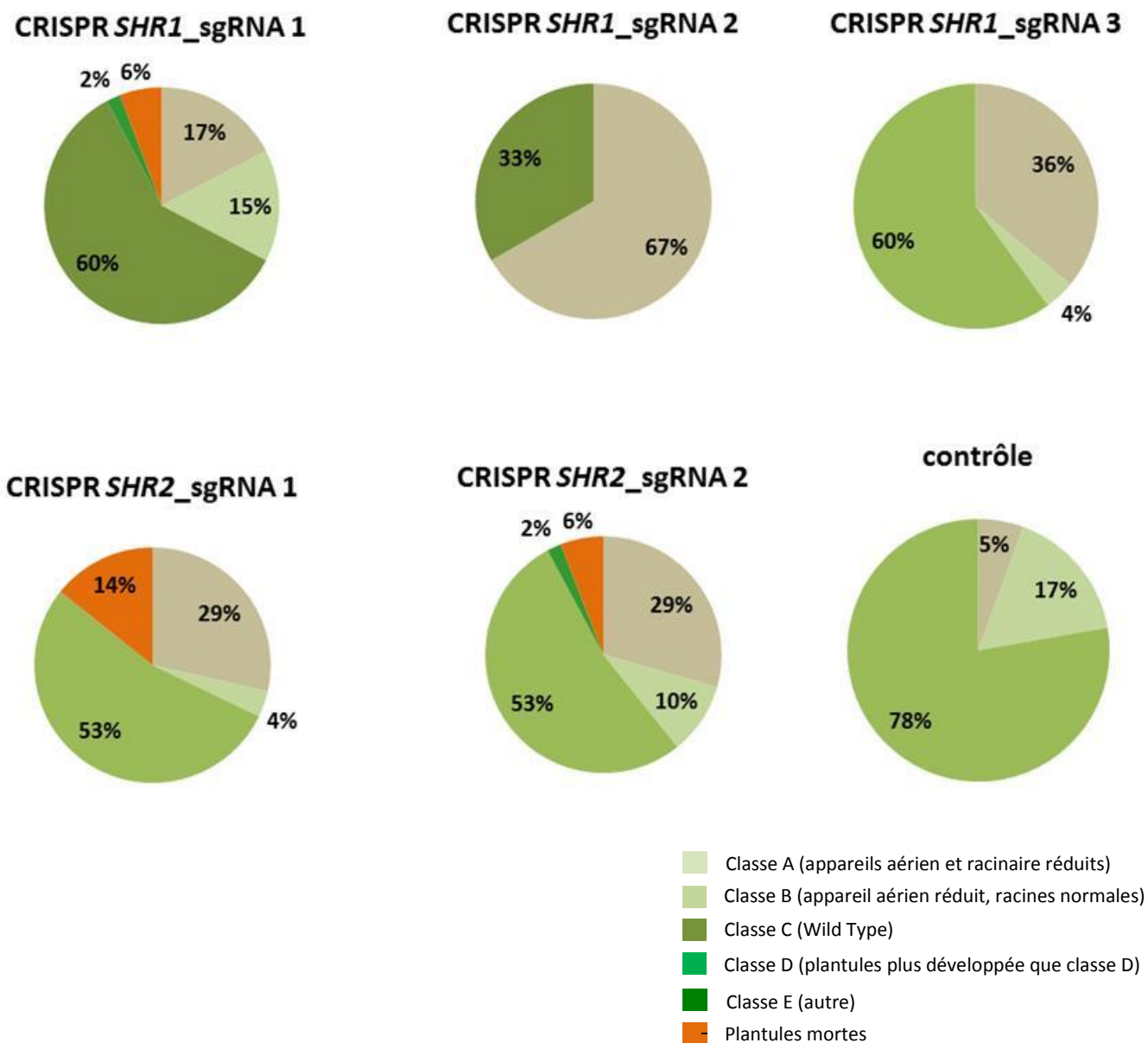
### Annexe 13 : Evolution du verdissement des cals CRISPR/Cas9 au cours de la régénération





#### Annexe 14: phénotypage des plantes CRISPR/Cas9 après 3 semaines en tube

Répartition des phénotypes de la lignée CRISPR\_SHR1 sgRNA n°1 (n=52), CRISPR\_SHR1 sgRNA n°2 (n=3), CRISPR\_SHR1 sgRNA n°3 (n=28), CRISPR\_SHR2 sgRNA n°1 (n=39), CRISPR\_SHR2 sgRNA n°2 (n=51), contrôle CRISPR\_GUS (n=19).



## Annexe 15 : Séquence des protéines tronquées des mutants KO *SHR1* & *SHR2*

Les alignements des séquences protéiques sur l'interface ClustalW.

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Les deux insertions dans la séquence *SHR1* provoquent des codons stop (rose) prématurés : à 5 acides aminés (mutants 1 à 11) ou 99 (mutant 12) après la méthionine (jaune).

Quatre insertions dans la séquence *SHR2* des mutants 1, 2, 3 et 4 d'une part et le mutant 6 d'autre part provoquent l'apparition de codons stop (rose) prématurés, positionnés à 8 acides aminés de la méthionine (jaune). La délétion de 4 nucléotides (mutant 5) engendre une protéine de 99 acides aminés, dont la séquence varie beaucoup avec celle de *SHR2*.

<b>SHR1</b>	<b>SHR1</b> Mutants 1 à 11	<pre> CCRLLLVAVA-MDTLFRVLVSLQAASEQQQQQQSASYNRSTTSSGSRSSSHQTNASYSY CCRLLLVAVA-MDTLFRVLVSLQAASEQQQQQQSASYNRSTTSSGSRSSSHQTNASYSY *****      *****      :      :      .      .      :      .      :      . </pre>
	<b>SHR1</b> Mutant 12	<pre> CCRLLLVAVA-MDTLFRVLVSLQAASEQQQQQQSASYNRSTTSSGSRSSSHQTNASYSY CCRLLLVAVA-MDTLFRVLVSLQAASEQQQQQQSASYNRSTTSSGSRSSSHQTNASYSY *****      *****      :      :      .      .      :      .      :      .  YHSSNSGGGGGGGGGGYYGGQPPPSQYYLEPYQEECGNAPHHQLYMD-----E LPPQQQRRRRRRRRRVLRLRPAAAAVAVLLPGAVPRMRQRPTPPALHGRLLLLVVVE ..:..      ...      .      ..      :      *      .      * </pre>
<b>SHR2</b>	<b>SHR2</b> Mutant 1, 2, 3 & 4	<pre> MDTLFRVLVSLHHHHHHQHAASPPDQPHKSYPPSSRGSTSSPSSHHTNNHTYYHSHSHY MDTLFQV----- **:: </pre>
	<b>SHR2</b> Mutant 5	<pre> MDTLFRVLVSLHHHHHHQHAASPPDQPHKSYPPSSRGSTSSPSSHHTNNHTYYHSHSHY MDTLCWLAS-----TTITTTSTRPHRRRTSRTSRTPPR----- **** *. *      ::      ....      :*:      :* *      :.* </pre>
	<b>SHR2</b> Mutant 6	<pre> MDTLFRVLVSLHHHHHHQHAASPPDQPHKSYPPSSRGSTSSPSSHHTNNHTYYHSHSHY MDTLFKV----- **:: </pre>

## Annexe 16 : phénotypage après transfert en serre des lignées CRISPR SHR1

t-test (p value  $\alpha < 0.05\%$ ). CRISPR *SHR1* sgRNA 1 n=49 (Ho n=11, He n=15, WT n=17), CRISPR *SHR1* sgRNA 3 n=28 (Ho n=1, He n=14, WT n=6), CRISPR *SHR1* (Ho n=12, He n=29, WT n=23) et contrôle n=12

### ➤ 3 semaines après le transfert en serre

TAILLE DES PLANTES	Ho	He	WT
CRISPR <i>SHR1</i> sgRNA 1	46.4 ± 11.4	39.59 ± 12.8	41.6 ± 10.0
CRISPR <i>SHR1</i> sgRNA 3	54	41.5 ± 12.6	51.4 ± 10.9
CRISPR <i>SHR1</i>	43.8 ± 15	39.8 ± 12.7	43.9 ± 10.8
CRISPR GUS contrôle			47.3 ± 11.7

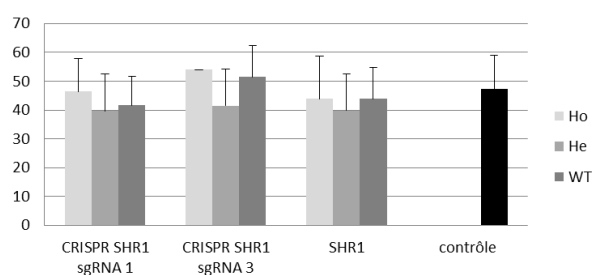
NOMBRE DE TALLES	Ho	He	WT
CRISPR <i>SHR1</i> sgRNA 1	4.25 ± 2.1 **	4.25 ± 2.1	4.9 ± 2.2
CRISPR <i>SHR1</i> sgRNA 3	6	4.0 ± 2.3	6.0 ± 2.0
CRISPR <i>SHR1</i>	3.6 ± 1.6 **	4.0 ± 2.2 **	5.1 ± 2.1
CRISPR GUS contrôle			7.2 ± 4.2

### ➤ 6 semaines après le transfert en serre

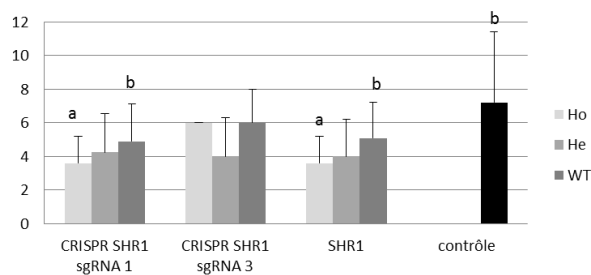
TAILLE DES PLANTES	Ho	He	WT
CRISPR <i>SHR1</i> sgRNA 1	84.1 ± 6.0	78.9 ± 16.6	74.8 ± 10.1
CRISPR <i>SHR1</i> sgRNA 3	90	76.9 ± 15.4	87.2 ± 12.2
CRISPR <i>SHR1</i>	77.3 ± 24.3	78.4 ± 15.7	78.0 ± 11.7
CRISPR GUS contrôle			80.4 ± 12.4

NOMBRE DE TALLES	Ho	He	WT
CRISPR <i>SHR1</i> sgRNA 1	6.0 ± 2.6 **	6.4 ± 3.8 **	6.4 ± 3.3
CRISPR <i>SHR1</i> sgRNA 3	13	5.50 ± 2.6 ***	8.2 ± 4.0
CRISPR <i>SHR1</i>	6.2 ± 3.6 **	5.9 ± 3.2 **	6.8 ± 3.5
CRISPR GUS contrôle			7.2 ± 4.2

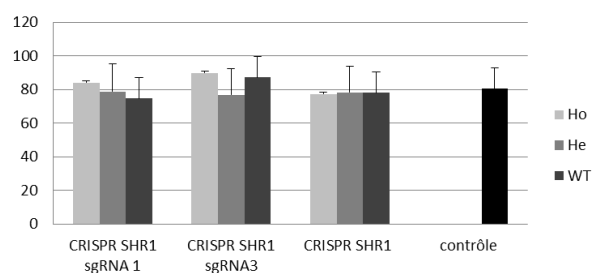
Taille des plantes après 3 semaines en serre



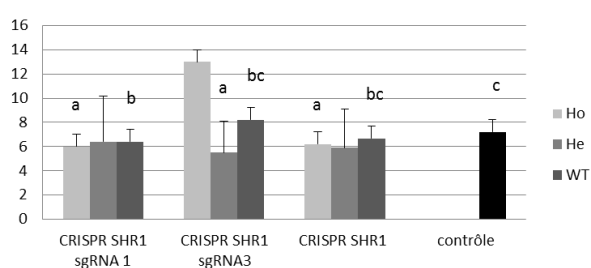
Nombre de talles par plante après 3 semaines en serre



taille des plantes après 6 semaines en serre



Nombre de talles par plante après 6 semaines en serre



## Annexe 17 : phénotypage après transfert en serre des lignées CRISPR SHR2

t-test (p value  $\alpha < 0.01\%$ ). CRISPR *SHR2* sgRNA 1 n=17 (Ho n=1, He n=12, WT n=4), CRISPR *SHR2* sgRNA 2 n=22 (Ho n=2, He n=10, WT n=14), CRISPR *SHR2* (Ho n=3, He n=22, WT n=18) et contrôle n=12

### ➤ 3 semaines après le transfert en serre

TAILLE DES PLANTES	Ho	He	WT
CRISPR <i>SHR2</i> sgRNA 1	59	49,7 ± 11,7	36,63 ± 21,41
CRISPR <i>SHR2</i> sgRNA 2	25,50 ± 9,19	44,90 ± 9,48	45,90 ± 8,13
CRISPR <i>SHR2</i>	36,7 ± 20,4	47,5 ± 10,4	42,6 ± 9,8
CRISPR GUS contrôle			47,3 ± 11,7

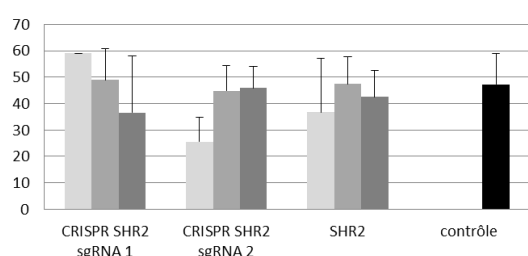
NOMBRE DE TALLES	Ho	He	WT
CRISPR <i>SHR2</i> sgRNA 1	2	6,08 ± 4,12	5,50 ± 2,65
CRISPR <i>SHR2</i> sgRNA 2	1,50 ± 0,71 ***	5,0 ± 2,79	4,40 ± 2,63
CRISPR <i>SHR2</i>	1,7 ± 0,6 ***	5,6 ± 3,5	4,7 ± 2,2
CRISPR GUS contrôle			7,2 ± 4,2

### ➤ 6 semaines après le transfert en serre

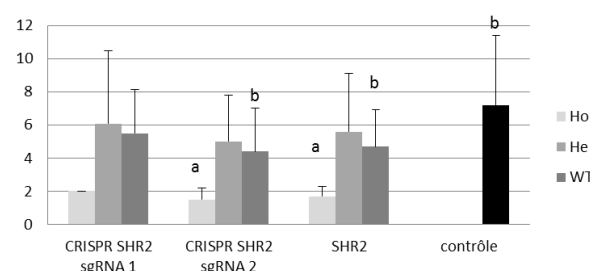
TAILLE DES PLANTES	Ho	He	WT
CRISPR <i>SHR2</i> sgRNA 1	87	85,36 ± 7,58	59,50 ± 37,63
CRISPR <i>SHR2</i> sgRNA 2	65,50 ± 16,26	79,70 ± 13,86	83,20 ± 8,77
CRISPR <i>SHR2</i>	72,7 ± 16,9	82,9 ± 11,1	73,9 ± 15,2
CRISPR GUS contrôle			80,4 ± 12,4

NOMBRE DE TALLES	Ho	He	WT
CRISPR <i>SHR2</i> sgRNA 1	6	8,45 ± 4,03	7,75 ± 5,32
CRISPR <i>SHR2</i> sgRNA 2	3,50 ± 3,54	8,10 ± 4,09	6,80 ± 3,79
CRISPR <i>SHR2</i>	4,3 ± 2,9 ***	8,3 ± 4,0	7,2 ± 3,2
CRISPR GUS contrôle			10,8 ± 5,1

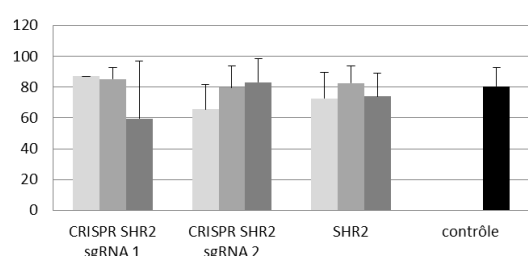
Taille des plantes après 3 semaines en serre



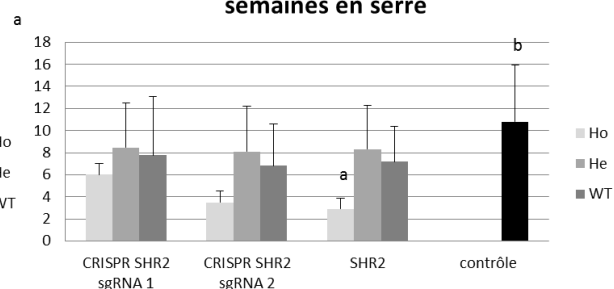
Nombre de talles par plante après 3 semaines en serre



Taille des plantes après 6 semaines en serre

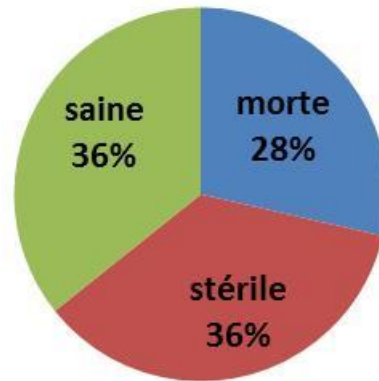


Nombre de talles par plante après 6 semaines en serre

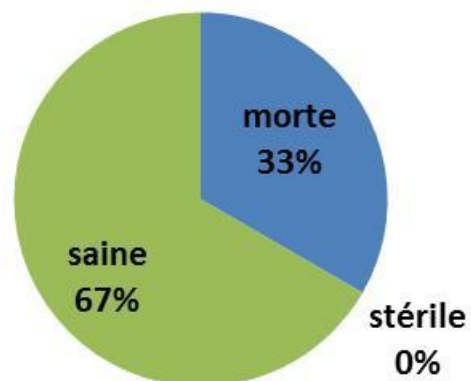


**Annexe 18: Fertilité des mutants KO Ho *shr1* et *shr2***

**Fertilité des KO *shr1* homozygotes**



**Fertilité des KO *shr2* homozygotes**



# Publications







# Immunoprofiling of Rice Root Cortex Reveals Two Cortical Subdomains

*Sophia Henry, Fanchon Divol, Mathilde Bettembourg, Charlotte Bureau, Emmanuel Guiderdoni, Christophe Périn\* and Anne Diévert\**

*CIRAD, UMR AGAP, Montpellier, France*

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Elison B. Blancaflor,  
The Samuel Roberts Noble  
Foundation, USA

### Reviewed by:

David Domozych,  
Skidmore College, USA  
Laura Elizabeth Bartley,  
University of Oklahoma, USA

### \*Correspondence:

Christophe Périn  
perin@cirad.fr;  
Anne Diévert  
anne.dievert@cirad.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Plant Cell Biology,  
a section of the journal  
Frontiers in Plant Science

**Received:** 13 October 2015

**Accepted:** 01 December 2015

**Published:** 07 January 2016

### Citation:

Henry S, Divol F, Bettembourg M,  
Bureau C, Guiderdoni E, Périn C and  
Diévert A (2016) Immunoprofiling of  
Rice Root Cortex Reveals Two Cortical  
Subdomains. *Front. Plant Sci.* 6:1139.  
doi: 10.3389/fpls.2015.01139

The formation and differentiation of aerenchyma, i.e., air-containing cavities that are critical for flooding tolerance, take place exclusively in the cortex. The understanding of development and differentiation of the cortex is thus an important issue; however, studies on this tissue are limited, partly because of the lack of available molecular tools. We screened a commercially available library of cell wall antibodies to identify markers of cortical tissue in rice roots. Out of the 174 antibodies screened, eight were cortex-specific. Our analysis revealed that two types of cortical tissues are present in rice root seedlings. We named these cell layers “inner” and “outer” based on their location relative to the stele. We then used the antibodies to clarify cell identity in lateral roots. Without these markers, previous studies could not distinguish between the cortex and sclerenchyma in small lateral roots. By immunostaining lateral root sections, we showed that the internal ground tissue in small lateral roots has outer cortical identity.

**Keywords:** rice root, cortex, markers, antibodies, lateral roots, tissue identity, confocal microscopy, confocal imaging

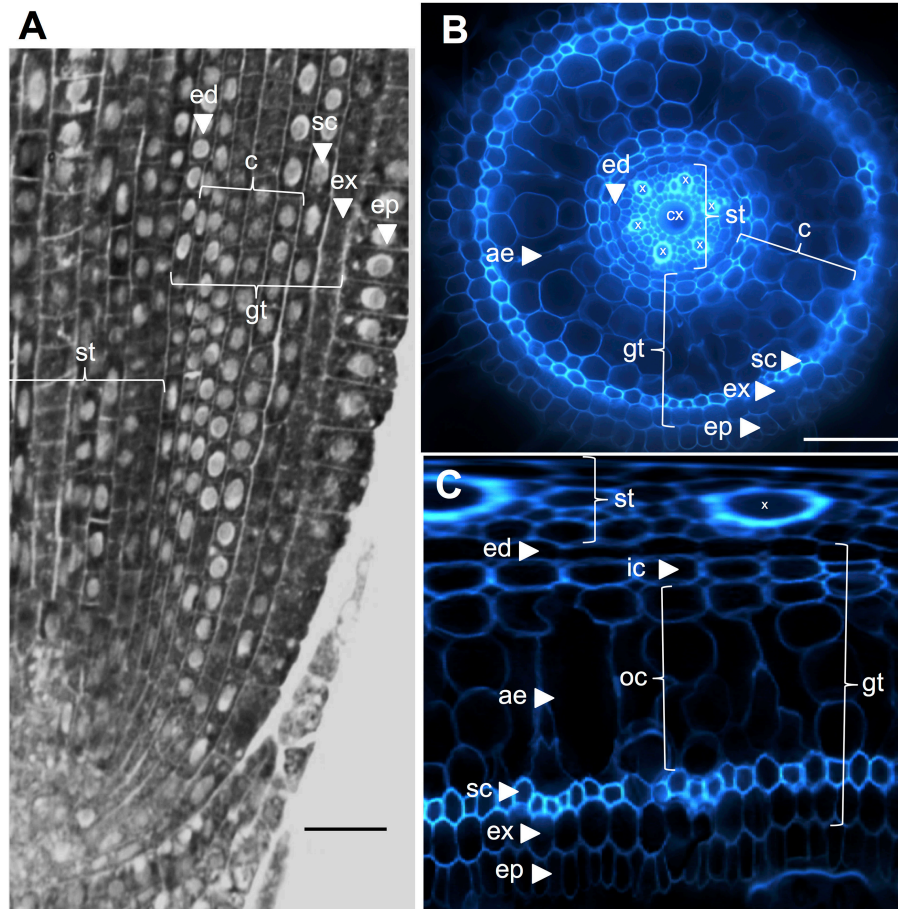
## INTRODUCTION

Rice has a complex root architecture with a mix of embryonic and post-embryonic roots. The radicle emerges first during germination, followed soon thereafter by embryonic coronary roots (Rebouillat et al., 2009; Coudert et al., 2010). The first adventitious post-embryonic roots resulting from shoot apical meristem activity appear a few days after seedling germination. Adventitious roots are also called coronary or crown roots and are produced throughout the life of a plant.

The internal rice root anatomy is well-described, particularly at the seedling stages (Rebouillat et al., 2009). Several concentric tissues (from the periphery to the stele) are located between the epidermis and the vascular tissues (**Figure 1**). These tissues, collectively referred to as “ground tissue,” are sometimes also referred to as the “cortex” (Lux et al., 2004). Here, we retain the generic term, i.e., ground tissue, to describe the exodermal, sclerenchyma, cortical, and endodermal tissues. We refer to the “cortex” as the tissue located between the endodermis and the sclerenchyma.

Ground tissue is composed of several layers of tissues that have the same parenchymatous origin but different specific characteristics that play various and important structural and functional roles in roots. For example, the exodermis and endodermis are apoplastic barriers that control the radial transport of water and nutrients from the soil to the photosynthetic organs, a feature mostly provided by suberin lamellae deposition and secondary cell wall differentiation (Gregory, 2006). Sclerenchyma are lignified cells that represent a critical barrier to some metals and possibly play a mechanical support role (Huang et al., 2012). In contrast to these three monolayer

**Abbreviations:** ae, aerenchyma; c, cortex; ed, endodermis; ep, epidermis; ex, exodermis; gt, ground tissue; ic, inner cortex; L-LLR, Large-type Large Lateral Root; oc, outer cortex; sc, sclerenchyma; SLR, Small Lateral Root; st, stele; T-LLR, Thin-type Large Lateral Root; x, xylem.



**FIGURE 1 | Anatomy of a 6-day-old Nipponbare radicle. (A)** Longitudinal section of a radicle fixed and paraplast embedded. Bar = 100  $\mu\text{m}$ . **(B)** Transverse section of a fresh radicle observed under UV light. Bar = 50  $\mu\text{m}$ . **(C)** Polar transformed view of B. Layers of tissues are labeled as follows: stele (st), ground tissue (gt) composed of several cell layers: one layer of endodermis (ed), several layers of cortex (c), one layer of sclerenchyma (sc), and one layer of exodermis (ex). The endodermal (ed) and exodermal (ex) layers are easily identified by the absence/reduction of fluorescence in the cell wall centers of these cells. The radicle is protected by one layer of epidermis (ep). Two types of cortical layers can be identified: inner cortex (ic), which is next to the endodermis (ed), and outer cortex (oc), which will eventually form aerenchyma (ae). In the stele, note the presence of a large central metaxylem (cx) surrounded by 6 metaxylem (x) vessels.

tissues, the cortical tissue in the rice radicle is composed of four or five layers. This tissue, also named the mid-cortex or mesodermis, is characterized by the schizogenous formation of spaces, leading to the formation of aerenchyma in rice (Justin and Armstrong, 1991; Kawai et al., 1998). Aerenchyma plays a major role in tolerance to flooding conditions and ensures continuous oxygen flow from the shoot to the root, allowing root growth under anoxic conditions. The cortex has an important but variable function in root physiology of numerous species and is involved in storage, flooding tolerance, or symbiotic interactions (Lux et al., 2004).

The radicle and crown roots produce three types of lateral roots: small lateral roots (SLRs) and two types of large lateral roots [Thin (T-LLRs) and Large (L-LLRs)] (Kawata and Shibayama, 1965; Kono et al., 1972; Rebouillat et al., 2009). This division is based on (i) root diameter: SLRs are the smallest (50–60  $\mu\text{m}$ ) and L-LLRs are the largest (120–150  $\mu\text{m}$ ),

(ii) ramifications, which are only observed on LLRs, (iii) the presence of a central metaxylem vessel only in LLRs, and (iv) the presence of a sclerenchyma layer only in L-LLRs (Kono et al., 1972; Kawata et al., 1977; Rebouillat et al., 2009). Despite this classification, the identity of internal root tissues in lateral roots, particularly SLRs, remains uncertain. Indeed, Rebouillat et al. (2009) and Kawata et al. (1977) both claimed that SLR ground tissue was comprised of the endodermis, sclerenchyma and exodermis (from the inside toward the outside), while in Kono et al. (1972), the inner-cortex sclerenchymatous cell layer was described as absent in SLRs and T-LLRs.

To solve this dilemma, and to study the development and function of particular tissues in general, the use of identity markers is required. Most of the tissue markers used until now are morphological markers or histochemical stains, which have provided a useful way to characterize cell identity. Berberine reveals the presence of suberin in cell walls, which is found

almost exclusively in the Casparian strips that surround each individual endodermis cell and is thus a good indirect marker of endodermal identity (Brundett et al., 1988). In *A. thaliana*, tissue-specific markers were also developed using tissue-specific promoters fused to reporter genes (GUS and/or GFP) in genetically modified plants. For instance, the *SCARECROW* promoter is used as an endodermal identity marker (Sugimoto et al., 2010). QC25 and QC46 enhancer trap GUS lines (Sabatini et al., 2003) and QHB in rice (Kamiya et al., 2003) were also identified as quiescent center (QC) markers based on their QC-specific expression. Despite interest in these markers, only a few are available and almost exclusively in *A. thaliana*. They also have drawbacks. For instance, the suitability of using the *SCARECROW* (*SCR*) promoter as an “endodermis” marker is debatable when specific questions on *SCR* and *SHORT ROOT* (*SHR*) roles in ground tissue differentiation are addressed. Indeed, the *SCR* and *SHR* genes are involved *per se* in endodermis/cortex formation (Wu and Gallagher, 2014). In *A. thaliana*, the only available root cortex markers are the *Co2* and *Co3* promoters (Heidstra et al., 2004; Ten Hove et al., 2010). In rice, these cortex markers are not yet used because there are no clear orthologs for the *Co2* and *Co3* genes. Only indirect morphological markers have been used to date in rice, such as aerenchyma formation for cortical identity (Rebouillat et al., 2009).

Another class of markers is commercially available antibodies directed against plant cell walls (<http://www.plantprobes.net/index.php>). These markers have been used scarcely in the past, but their efficiency has been demonstrated. For instance, the CCRC-M2 and JIM13 cell wall antibodies were used in *A. thaliana* to show that the single layer of internal tissue present in the *shr* mutant had cortical identity while the ground tissue layer of the *scr* mutant exhibited multiple identities (Di Laurenzio et al., 1996; Helariutta et al., 2000). These markers have many advantages: their simplicity and the possibility of combining secondary antibodies coupled to different fluorochromes to limit overlapping with auto-fluorescence, they do not require genetic transformation and they can be used to complement other classes of markers.

In this paper, we first describe a simple medium-throughput protocol for immunolabeling fresh vibratome tissue sections. Using this protocol, we screened radial sections of rice radicles with a large library of 174 cell wall antibodies. Among these, we identified eight cortex-specific markers and demonstrated that rice possesses two types of cortical tissues with distinct identity. We called these layers the inner and outer cortex based on their respective anatomical position in the root sections. To demonstrate the usefulness of these cortex-specific markers, we clarified the ground tissue identities of lateral roots using three of these antibodies. In SLRs in particular, we show that the internal tissue layer has an outer cortical identity. Our protocol is generic enough to be used for the development of tissue markers in any species without the need to generate transgenic plants. This protocol can be easily adapted with fresh shoot, leaf, root, or any tissues in other plants and represents a simple and easy way to identify tissue-specific markers. Moreover, these markers can be used in conjunction with other molecular markers.

## RESULTS

### Immunoprofiling of Cell Wall Antibodies in Rice Root Radial Sections Reveals Specific Antibodies for Cortex Layers

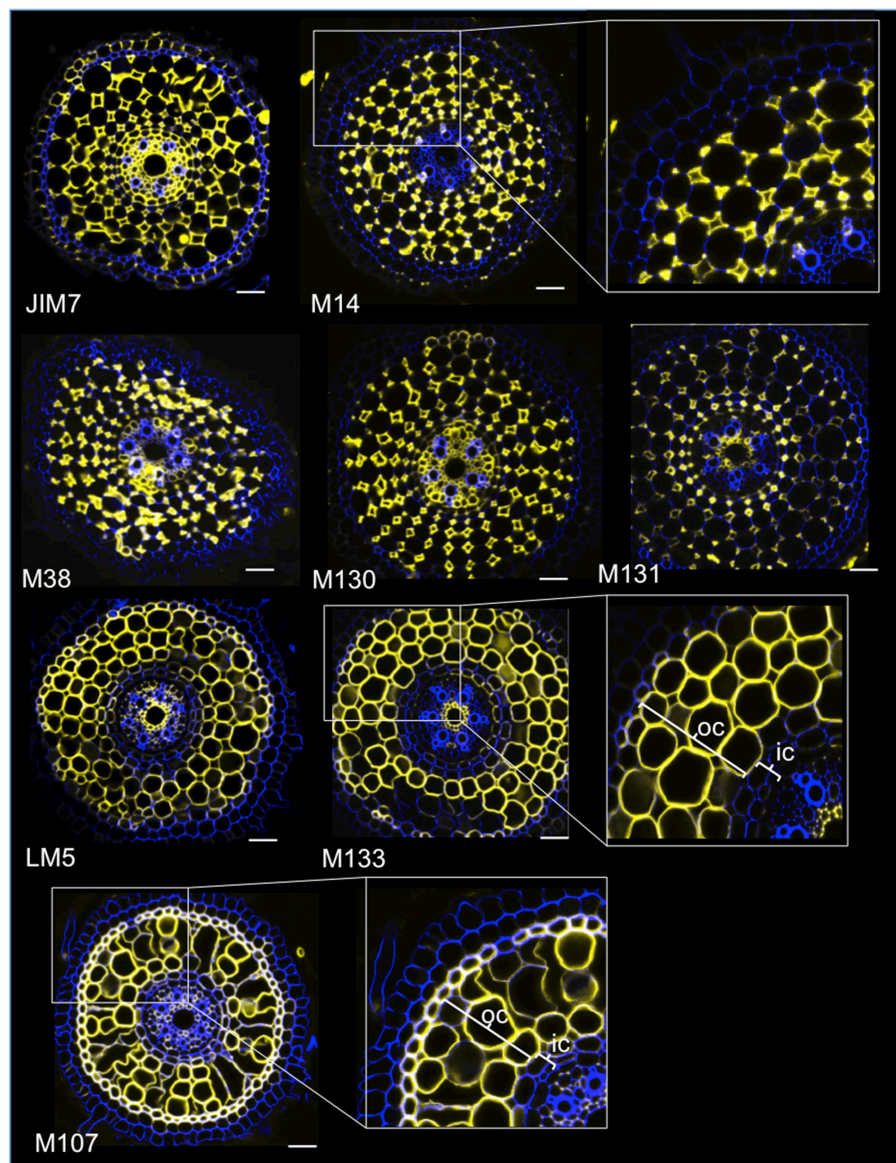
With the aim of identifying antibody-based markers for cortical cells, we first established a protocol for medium throughput immunolabeling of radial sections of fresh rice roots (see Materials and Methods and Supplementary Figure 1 for details). Then, we performed a screen with monoclonal antibodies raised against cell wall components (from the Complex Carbohydrate Research Center (CarboSource Services, Athens Georgia, USA) and Paul Knox Cell Wall lab (university of Leeds, UK), see Materials and Methods for details) to identify cortex markers. From the 174 antibodies tested, only 12 were retained as putatively cortex specific. We tested their repeatability by performing two additional experiments and concluded that eight antibodies displayed similar and robust profiles among the three replicates (**Figure 2**). Five antibodies (JIM7, M14, M38, M130, and M131) provided the same immunolabeling pattern in the cortex. Only non-adjacent cell walls were labeled, resulting in a singular “diamond shape” labeling of all cortical cells. For the three other antibodies (LM5, M133, and M107), the labeling was detected in the cortex and sometimes the sclerenchyma cells, particularly with the LM5 and M107 antibodies. The signal was homogeneous on the cortex cell wall, but was much weaker in the inner cortex layers (the layer of cortex adjacent to the endodermal layer) than in the outer cortex layers. Thus, all of these antibodies with profiles that are complementary to cortical tissues are specific markers that can be used to analyze cortical cell identity. Moreover, the two different cortical labels, defining two subcortical areas, suggest that the outer and inner layers have a distinct molecular identity that was revealed by these antibodies.

Some specific features of these two subcortical layers were highlighted when the “polar transformer” plugin of the ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>) was used to view the images of the root sections (**Figures 1B,C**; Schneider et al., 2012; Lartaud et al., 2014). The inner cells were characterized by a thick cell wall compared with the outer cells, which exhibited various air-containing cavities resulting from cell wall fusion. The inner cortical cells also exhibited a flattened shape resembling endodermal cells, in contrast to the outer cells, which were rounder. In this transformed picture, the radial cell wall that is wall running from the inner side of the cell to the outer side, autofluorescence of the endodermal and exodermal cells are not visible, presumably due to the presence of Casparian strips. Similarly, but to a lesser extent, small holes exempt of autofluorescence were also visible on the radial cell walls of inner cortical cells.

### All Lateral Root Types Possess Only Outer Cortical Tissue

To demonstrate the usefulness of the cortex markers and to characterize cell identities, we labeled the three rice lateral root types (L-LLR, T-LLR and SLR) with three of these antibodies

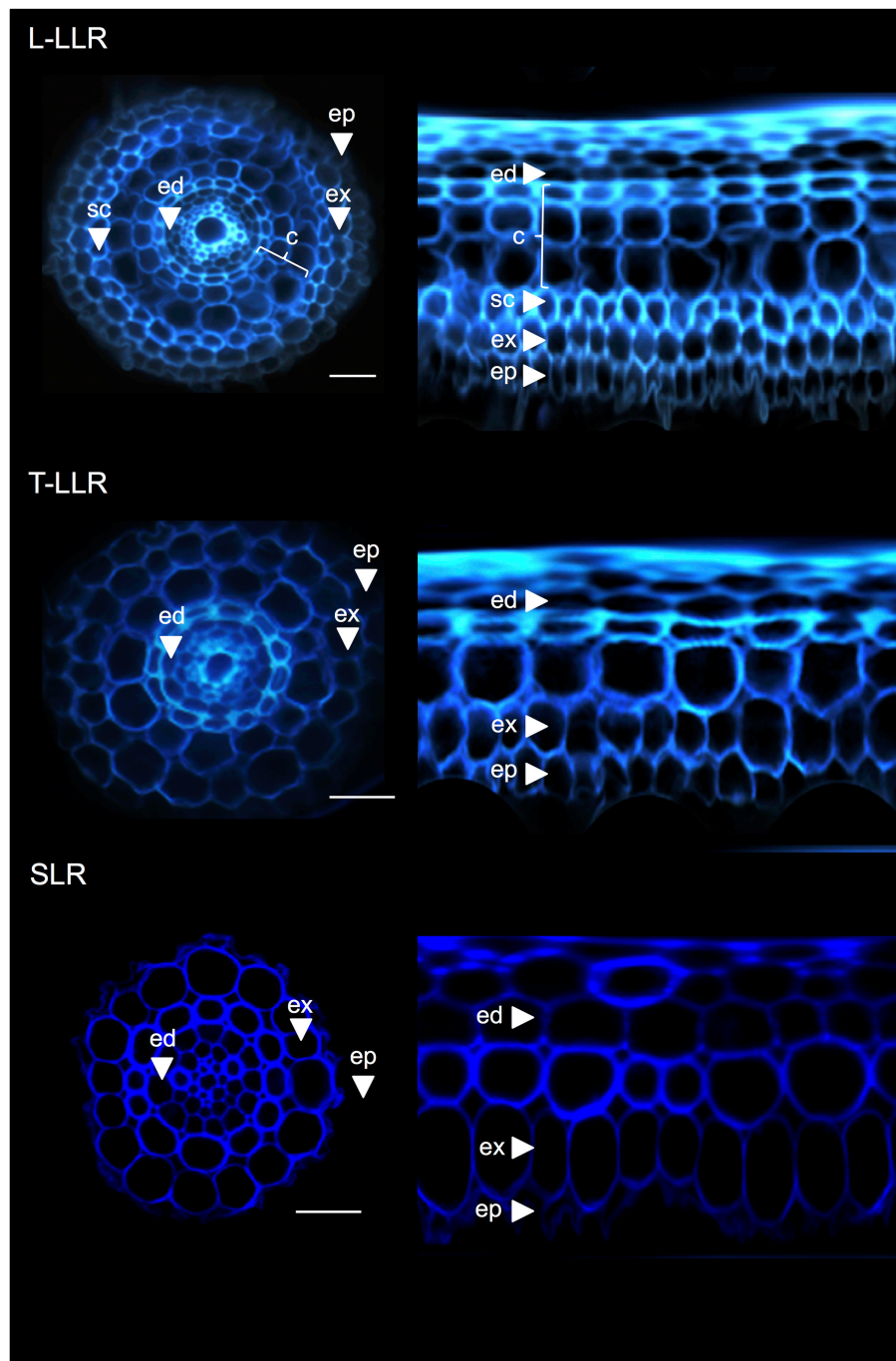




**FIGURE 2 | Identification of eight specific cortex antibodies (JIM7, M14, M38, M130, M131, LM5, M133, and M107) among the 174 screened from the monoclonal cell wall antibody library.** For each antibody, merged images of transverse sections were obtained under a confocal microscope after immunohistological labeling: in yellow, antibody pattern at 561 nm, and in blue, cell wall autofluorescence under UV light. Five antibodies (JIM7, M14, M38, M130, and M131) show a similar profile within all cortical cell layers stained (diamond shapes). Three antibodies (LM5, M133, and M107) homogeneously labeled cortical cell walls. Note that for these antibodies, inner cortical (ic) layers are not stained compared with outer cortical (oc) layers. Insets are close-ups of the corresponding images. Bars = 20  $\mu$ m.

(M107, M133, and M14). For this experiment, because L-LLRs do not often develop on Petri dishes, lateral roots were collected from rice seedlings grown under hydroponic conditions for 2 weeks. We first analyzed the ground tissue organization of each type of lateral root by observing the autofluorescence of the cell walls in the transverse and polar views of the root sections (**Figure 3**). This first analysis revealed slightly distinct internal radial anatomy for the three types of lateral roots. Similar to the radicle sections viewed under UV light, the endodermal,

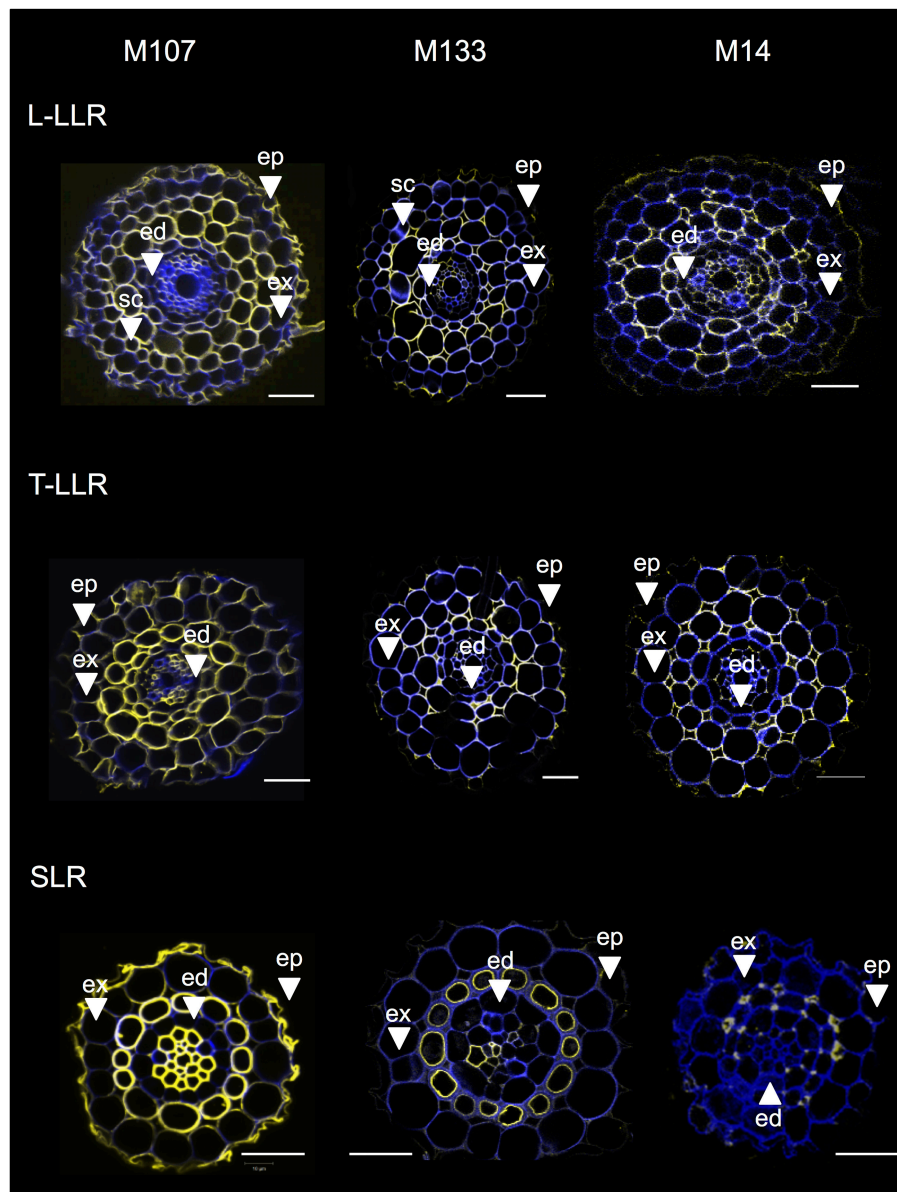
and exodermal tissues can be identified by the fluorescence extinction in the center of the radial cell walls. These two tissues were present in all lateral roots. Between the endodermis and exodermis, several tissue layers were present in the L-LLRs and T-LLRs while the SLRs possessed only a single (unidentified) cell layer. The anatomy of the L-LLRs looked like seminal roots and external to the endodermis, several layers of cortical tissue were easily identified when aerenchyma tissue was formed. In addition, a sclerenchyma layer formed of closely packed cells



**FIGURE 3 | Tissue composition of the Large Lateral Root types (Large-LLR and Thin-LLR) and Small Lateral Root (SLR).** Seedlings were grown under hydroponic conditions for 2 weeks. Cell wall autofluorescence of transverse sections and polar transformed view under UV light. Tissues are labeled as follows: epidermis (ep), exodermis (ex), cortex (c), endodermis (ed). Note that the epidermis (ep) was often fragmented during the course of the experiment. Bars = 20  $\mu$ m.

with wide cell walls was also observed. Depending on the experiment, this cell layer was not always completely developed. In the T-LLR sections, the external layer resembled cortical tissue and the internal layer resembled the single (unidentified) SLR layer.

To identify the cell layers present in the SLR and T-LLR ground tissues and to confirm the cortical identity in the L-LLRs, we immunolabeled lateral root sections with three cortex-specific antibodies (M107, M133 and M14; **Figure 4**). The M107 and M133 antibodies labeled all cell



**FIGURE 4 | Merged images of the Large Lateral Root types (Large-LLR and Thin-LLR) and Small Lateral Root (SLR) sections immunolabeled with M107, M133, and M14.** Seedlings were grown under hydroponic conditions for 2 weeks. In yellow, antibody labeling at 561 nm, and in blue, autofluorescence under UV light. Tissues are labeled as follows: epidermis (ep), exodermis (ex), cortex (c), endodermis (ed). Note that the epidermis (ep) was often fragmented during the course of the experiment. Bars = 20  $\mu$ m.

layers located between the endodermis and exodermis in all lateral roots. Based on radicle staining for these antibodies, this observation indicated that these cell layers could have sclerenchyma or cortical identity. However, the fact that M14 also immunolabeled these layers, particularly in the SLR sections, clearly demonstrates that these layers had outer cortical identity.

Variations in the number of outer cortical cell layers (one in the SLRs, two in the T-LLRs, three in the L-LLRs and four to five in the radicle) play a major role in rice root diameters (Figure 5).

## CONCLUSIONS

Different terms have already been used to qualify subcortical areas in plants. For example, the presence of an “inner” lignified cortex layer, comparable to the one studied here, has already been described in wild rice (Yang et al., 2014). In maize, the two cortical domains are defined differently (Baluška et al., 1993). The “inner” domain forms aerenchyma, corresponding to the outer cortex here, and the “middle-outer” cortex is a lignified support tissue, which could be sclerenchyma. In *Arabidopsis*, a “middle cortex” cell layer, located between the cortical monolayer



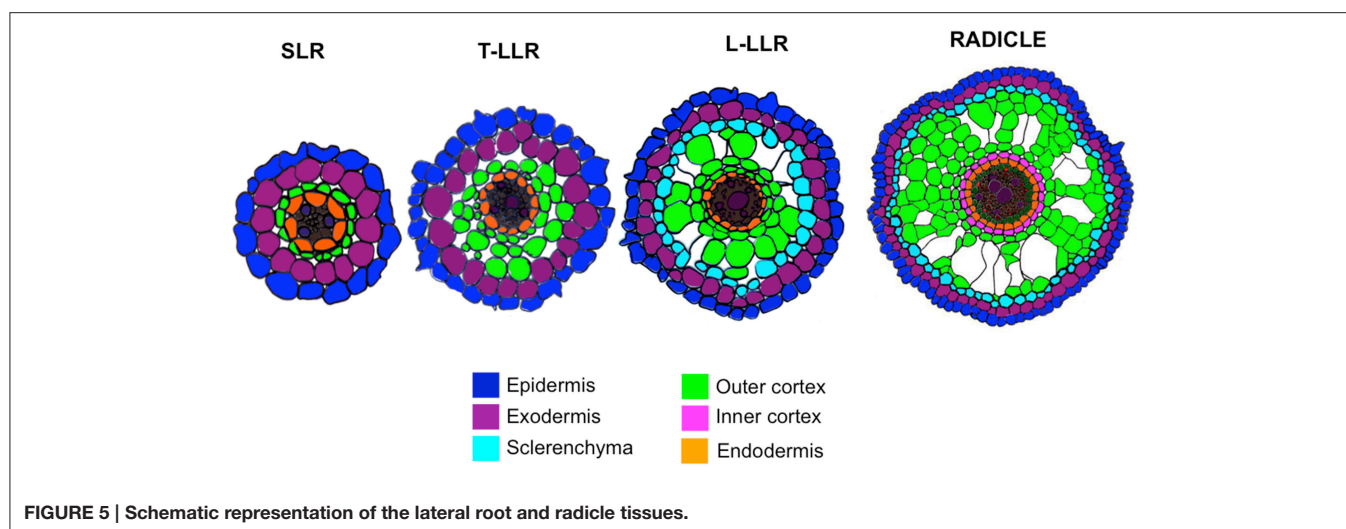


FIGURE 5 | Schematic representation of the lateral root and radicle tissues.

and the endodermis, has also been described (Baum et al., 2002; Paquette and Benfey, 2005). Recent results suggest that this cortex layer, whose formation is regulated by GA, oxidative stress, and SHR and SCR among others, plays a role in abiotic tolerance (Paquette and Benfey, 2005; Cui and Benfey, 2009; Pauluzzi et al., 2012; Wu and Gallagher, 2014). Interestingly, this layer is also described as a helix-like layer with a typical shape (Baum et al., 2002). Could this *Arabidopsis* “middle cortex” layer be functionally and structurally similar to the inner cortex layer of the rice radicle? In longitudinal and transverse sections of rice, the inner cortical layer also usually forms a helix, suggesting these two tissue layers could be comparable. In *Arabidopsis*, the “middle cortex” layer is derived from an endodermis periclinal division, which appears away from the QC between 7 and 14 days after germination (Paquette and Benfey, 2005). New tools will be necessary to verify these important parameters in rice. For example, no mutant affecting the timing of formation of this layer has been described up to now. Moreover, technical advances in imaging the rice QC are also required. Nevertheless, our cortex-specific markers offer a new tool to compare the function and molecular network involved in inner cortex (rice) vs. “middle cortex” (*Arabidopsis*) formation. Work is ongoing in our laboratory to identify the molecular determinants of inner and outer cortex formation, with SCR and SHR rice orthologs as first candidates for the regulation of cortex formation in rice roots (Pauluzzi et al., 2012).

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Material

#### Six-Day-Old Seedlings

Seeds of the *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* Nipponbare cultivar were grown vertically in sterile Petri dishes (Corning, 431301; 20 × 20 cm) under controlled conditions (day/night rhythm: 12/12 h, 28/25°C, light intensity: 500  $\mu$ E m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). First, the seeds were surface-sterilized by rinsing in 70% ethanol for ~1 min. Then, ethanol was replaced by a solution composed of

40% bleach in distilled water containing three drops of tween 80 (Sigma-Aldrich P4780-500 mL). The seeds were soaked in this solution for 30 min with gentle agitation, and then rinsed at least four times with sterile distilled water. Hot (~50°C) autoclave sterilized half strength Murashige and Skoog (MS/2) medium (250 mL) is poured in Petri dishes, and let solidify for ~45 min. The MS/2 solid medium is composed of 2.15 g.L<sup>-1</sup> of MS medium basal salt mixture (Duchefa Biochemie, M0221), 75 mg.L<sup>-1</sup> of MS vitamin mixture (Duchefa Biochemie, M0409), and 8 g.L<sup>-1</sup> of agarose type II (Sigma-Aldrich, A6877). Sterile seeds are then pushed into the solidified MS/2 medium with the radicle oriented downwards. Roots were harvested after 6 days of growth.

### Four-Week-Old Plants

After 3 days of germination in water, the seedlings were transferred to a hydroponic system under controlled conditions (day/night rhythm: 12/12 h, 28/25°C, light intensity: 500  $\mu$ E m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, relative humidity: 55%). Hydroponic system consists of a 50 L plastic box containing 30 L of hydroponic solution on which a 1 cm thick foam mattress is laid. The foam mattress is pierced with gaps to maintain seedling stem bases. The hydroponic medium is composed of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5 mM), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1.6 mM), Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (1.2 mM), KNO<sub>3</sub> (0.7 mM), FeSO<sub>4</sub> (0.1 mM), Na<sub>2</sub>EDTA (0.1 mM), MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (1.7  $\mu$ M), (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O (0.2  $\mu$ M), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.2  $\mu$ M), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.2  $\mu$ M), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (1.4  $\mu$ M), and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.6 mM). The solution is aerated by a pump placed at the bottom of the plastic box and changed every 10 days. The pH was adjusted and maintained at 5.4 ± 0.2.

### Fresh Root Sectioning

The tips of growing radicles or lateral roots (2 cm) were cut using a sharp blade and placed parallel to each other to align the root tips (Supplementary Figures 1A,B). They were embedded in one drop of 3% melted agarose (50°C; Supplementary Figure 1C). Patches containing root tips were inserted into a 3 × 1 × 1-cm well filled with 3% melted agarose (Supplementary Figure 1D).



After solidification, blocks were resized and glued on a vibratome plate to be sliced. The vibratome (Hm650v (Thermo Scientific Microm)) parameters were speed 30, frequency 70, amplitude 0.8, and thickness 60  $\mu\text{m}$  (Supplementary Figure 1E). Sections were transferred either onto chamber slides (Lab-teak 177402) for immunostaining (Supplementary Figure 1F), or onto slides humidified with 1X alkaline phosphate buffer (PBS, Sigma-Aldrich P3813) for observation.

### Immunolocalization

The sections placed on the chamber slides (three per chamber) were first rinsed in 0.1 M glycine supplemented with 1X PBS and then twice in 1X PBS, each for 10 min. The tissues were then immersed in a PBS solution containing 5% bovine fetal serum (blocking solution, Thermo Fisher 37520) at 4°C overnight under agitation. Primary antibodies, diluted 1/10 in this blocking solution, were applied overnight at 4°C under agitation. The sections were then rinsed 3 times in PBS 1X for 10 min. The root sections were incubated for 2 h with the secondary antibody diluted 500-fold in blocking solution under agitation. These antibodies were coupled to a fluorophore, Alexa 546 anti-rat antibody (Invitrogen A11081) or Alexa 546 anti-mouse antibody (Invitrogen A11060). Then, the sections were rinsed again three times in 1X PBS under agitation, for 10 min each. The chambers were removed and few drops of mowiol mounting media (Sigma-Aldrich 81381) were added. A coverslip was placed on the root sections, which were allowed to dry for 36 h at 4°C in the dark.

### Paraplast Fixation

Radicles grown on Petri dishes for 6 days were fixed in 4% paraformaldehyde (in PBS 1X) overnight at 4°C and rinsed twice using PBS 1X (Jackson, 1991). The fixed tissues were dehydrated in ethanol, cleared in Histochoice Clearing Agent (HistoClear, Sigma Aldrich), and embedded in Paraplast (Fisher). The tissues

were sectioned (6  $\mu\text{m}$  thick) on a Leica RM2255 microtome and mounted on SuperfrostPlus slides (Fisher).

### Microscopy

Bright field and autofluorescence observations were performed using a Leica DM4500 microscope. For autofluorescence, images were taken with the “A” filter cube (excitation range: UV; excitation filter: BP 340–380; suppression filter: LP 425). Immunostained sections were observed with confocal microscopes: Zeiss LSM 510 or Leica SP8. The cell walls were first visualized using autofluorescence [720-nm (chameleon laser) or 405-nm respectively]. The secondary antibody was visualized using a Helium/Neon laser at 543 or 561 nm respectively. Pictures were taken with a color Retiga 2000R camera (QIMAGING, Canada) running Volocity image acquisition software (Improvision, UK).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

SH, FD, MB, CB: acquisition of data; SH, CP, AD analysis of data; SH, EG, CP, AD: drafting of the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank MRI (Montpellier RIO Imaging platform), PHIV and La Gaillarde Platforms for their technical support for immunolocalization and/or confocal and multiphoton imaging. SH is supported by a CIRAD PhD fellowship.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.01139>

## REFERENCES

- Baluška, F., Brailsford, R. W., Hauskrecht, M., Jackson, M. B., and Barlow, P. W. (1993). Cellular dimorphism in the maize root cortex: involvement of microtubules, ethylene and gibberellin in the differentiation of cellular behaviour in postmitotic growth zones. *Bot. Acta* 106, 394–403. doi: 10.1111/j.1438-8677.1993.tb00766.x
- Baum, S. F., Dubrovsky, J. G., and Rost, T. L. (2002). Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) roots. *Am. J. Bot.* 89, 908–920. doi: 10.3732/ajb.89.6.908
- Brundett, M. C., Enstone, D. E., and Peterson, C. A. (1988). A Berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue. *Protoplasma* 146, 133–142. doi: 10.1007/BF01405922
- Coudert, Y., Périn, C., Courtois, B., Khong, N. G., and Gantet, P. (2010). Genetic control of root development in rice, the model cereal. *Trends Plant Sci.* 15, 219–226. doi: 10.1016/j.tplants.2010.01.008
- Cui, H., and Benfey, P. N. (2009). Interplay between SCARECROW, GA and LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 in ground tissue patterning in the *Arabidopsis* root. *Plant J.* 58, 1016–1027. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03839.x
- Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., et al. (1996). The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86, 423–433. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80115-4
- Gregory, P. J. (2006). *Plant Roots: Growth, Activity, and Interaction with Soils*. Oxford; Ames, IA: Blackwell Pub.
- Heidstra, R., Welch, D., and Scheres, B. (2004). Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect *Arabidopsis* SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes Dev.* 18, 1964–1969. doi: 10.1101/gad.305504
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., et al. (2000). The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101, 555–567. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80865-X
- Huang, C. F., Yamaji, N., Ono, K., and Ma, J. F. (2012). A leucine-rich repeat receptor-like kinase gene is involved in the specification of outer cell layers in rice roots. *Plant J.* 69, 565–576. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04824.x
- Jackson, D. (1991). “In-situ hybridization in plants” in *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach*, eds D. J. Bowles, M. McPherson, and S. J. Gurr (Totowa, NJ: Humana Press), 163–174.
- Justin, S. H. F. W., and Armstrong, W. (1991). Evidence for the involvement of ethylene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytol.* 118, 49–62. doi: 10.1111/j.1469-8137.1991.tb00564.x
- Kamiya, N., Nagasaki, H., Morikami, A., Sato, Y., and Matsuoka, M. (2003). Isolation and characterization of a rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *Plant J.* 35, 429–441. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01816.x

- Kawai, M., Samarajeewa, P. K., Barrero, R. A., Nishiguchi, M., and Uchimiya, H. (1998). Cellular dissection of the degradation pattern of cortical cell death during aerenchyma formation of rice roots. *Planta* 204, 277–287. doi: 10.1007/s004250050257
- Kawata, S., Sasaki, O., and Yamazaki, K. (1977). On the structure of the crown root and the lateral root, and the vessel connection between them, in rice plants. *Jpn. J. Crop. Sci.* 46, 569–579. doi: 10.1626/jcs.46.569
- Kawata, S., and Shibayama, B. (1965). On the lateral root primordia formation in the crown roots of rice plant. *Proc. Crop Sci. Soc. Jpn.* 33, 423–431. doi: 10.1626/jcs.33.423
- Kono, Y., Igeta, M., and Yamada, N. (1972). Studies on the developmental physiology of the lateral roots in rice seminal roots. *Jpn. J. Crop. Sci.* 41, 192–204. doi: 10.1626/jcs.41.192
- Lartaud, M., Perin, C., Courtois, B., Thomas, E., Henry, S., Bettembourg, M., et al. (2014). PHIV-RootCell: a supervised image analysis tool for rice root anatomical parameter quantification. *Front. Plant Sci.* 5:790. doi: 10.3389/fpls.2014.00790
- Lux, A., Luxova, M., Abe, J., and Morita, S. (2004). Root cortex: structural and functional variability and responses to environmental stress. *Root Res.* 13, 117–131. doi: 10.3117/rootres.13.117
- Paquette, A. J., and Benfey, P. N. (2005). Maturation of the ground tissue of the root is regulated by gibberellin and SCARECROW and requires SHORT-ROOT. *Plant Physiol.* 138, 636–640. doi: 10.1104/pp.104.058362
- Pauluzzi, G., Divol, F., Puig, J., Guiderdoni, E., Dievart, A., and Périn, C. (2012). Surfing along the root ground tissue gene network. *Dev. Biol.* 365, 14–22. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.02.007
- Rebouillat, J., Dievart, A., Verdeil, J., Escoute, J., Giese, G., Breitler, J., et al. (2009). Molecular genetics of rice root development. *Rice* 2, 15–34. doi: 10.1007/s12284-008-9016-5
- Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., and Scheres, B. (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes Dev.* 17, 354–358. doi: 10.1101/gad.252503
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089
- Sugimoto, K., Jiao, Y., and Meyerowitz, E. M. (2010). Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev. Cell* 18, 463–471. doi: 10.1016/j.devcel.2010.02.004
- Ten Hove, C. A., Willemsen, V., de Vries, W. J., Van Dijken, A., Scheres, B., and Heidstra, R. (2010). SCHIZORIZA encodes a nuclear factor regulating asymmetry of stem cell divisions in the Arabidopsis root. *Curr. Biol.* 20, 452–457. doi: 10.1016/j.cub.2010.01.018
- Wu, S., and Gallagher, K. L. (2014). The movement of the non-cell-autonomous transcription factor, SHORT-ROOT relies on the endomembrane system. *Plant J.* 80, 396–409. doi: 10.1111/tpj.12640
- Yang, C., Zhang, X., Li, J., Bao, M., Ni, D., and Seago, J. L. (2014). Anatomy and histochemistry of roots and shoots in wild rice (*Zizania latifolia* Griseb.). *J. Bot.* 2014, 9. doi: 10.1155/2014/181727

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Henry, Divol, Bettembourg, Bureau, Guiderdoni, Périn and Diévert. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# A plausible mechanism, based upon SHORT-ROOT movement, for regulating the number of cortex cell layers in roots

Shuang Wu<sup>a</sup>, Chin-Mei Lee<sup>a</sup>, Tomomi Hayashi<sup>a,1</sup>, Simara Price<sup>a</sup>, Fanchon Divo<sup>b</sup>, Sophia Henry<sup>b</sup>, Germain Pauluzzi<sup>b</sup>, Christophe Perin<sup>b</sup>, and Kimberly L. Gallagher<sup>a,2</sup>

<sup>a</sup>Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104; and <sup>b</sup>Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UMR Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes Cultivées (AGAP), F34398 Montpellier, France

Edited by G. Venugopala Reddy, University of California, Riverside, CA, and accepted by the Editorial Board September 25, 2014 (received for review April 23, 2014)

**Formation of specialized cells and tissues at defined times and in specific positions is essential for the development of multicellular organisms. Often this developmental precision is achieved through intercellular signaling networks, which establish patterns of differential gene expression and ultimately the specification of distinct cell fates. Here we address the question of how the SHORT-ROOT (SHR) proteins from *Arabidopsis thaliana* (AtSHR), *Brachypodium distachyon* (BdSHR), and *Oryza sativa* (OsSHR1 and OsSHR2) function in patterning the root ground tissue. We find that all of the SHR proteins function as mobile signals in *A. thaliana* and all of the SHR homologs physically interact with the AtSHR binding protein, SCARECROW (SCR). Unlike AtSHR, movement of the SHR homologs was not limited to the endodermis. Instead, the SHR proteins moved multiple cell layers and determined the number of cortex, not endodermal, cell layers formed in the root. Our results in *A. thaliana* are consistent with a mechanism by which the regulated movement of the SHR transcription factor determines the number of cortex cell layers produced in the roots of *B. distachyon* and *O. sativa*. These data also provide a new model for ground tissue patterning in *A. thaliana* in which the ability to form a functional endodermis is spatially limited independently of SHR.**

SHORT-ROOT | root development | cellular patterning | SCARECROW | rice

The root of *Arabidopsis thaliana* is composed of distinct single cell layers that are concentrically arranged around a central core of largely vascular tissues, which, along with the pericycle, forms the stele. The ground tissue layers, endodermis plus cortex, directly surround the stele. The ground tissue of most, if not all, roots contains a single layer of endodermis, which forms a water-impermeable barrier that protects the vascular tissues. To the outside of the endodermis is the cortex. The number of cortex cell layers differs between roots of different species, and in some cases, between roots (e.g., primary versus lateral) on the same plant. In *A. thaliana*, where root development has been extensively examined, the number of ground tissue layers in both primary and secondary roots is two, with a single endodermal and a single cortical cell layer (1). In contrast, the roots of both *Brachypodium distachyon* and *Oryza sativa* (rice) have a single layer of endodermis but multiple layers of cortex, with the number of cortex cell layers varying between root types (2, 3). For example, in the primary root of rice, there are five to six layers of cortex, but in some of the thin lateral roots, there may be only one layer of cortex. In all roots, it is thought that the number of endodermal cell layers is controlled through the conserved function and regulation of the SHR transcriptional network (4); however, it is not known how the number of cortex cell layers is adjusted. Here we show that controlled movement of SHORT-ROOT (SHR) in *A. thaliana* regulates the number of cortex cell layers independent of the number of endodermal cell layers. SHR movement may therefore represent a tunable mechanism for controlling the number of cortex cell layers in roots.

In *A. thaliana*, as in other dicots, the endodermis and cortex are clonally related cell layers that arise from the asymmetric periclinal cell divisions of a cortical endodermal daughter (CED) cell located at the tip of the root adjacent to the stele. Division of the CED is under the control of the SHR and the SCARECROW (SCR) transcription factors. The SHR protein is expressed in the stele and moves into the neighboring endodermis and CED cells where it activates the expression of the downstream transcription factor, SCR. In the CED, SHR and SCR together activate expression of a D-type cyclin (CYCD6;1), which triggers periclinal division of the CED (5–8). The CED cells of roots that lack SHR or SCR fail to divide periclinally and therefore form only a single layer of ground tissue. Roots that lack SHR fail to specify an endodermis, so the single ground tissue layer in *shr-2* null mutants has cortex cell identity. In contrast, roots that lack SCR form a chimeric ground tissue layer with aspects of both cortical and endodermal cell fates. These results show that SHR, independent of cell division, is required for endodermal cell fate.

The prevailing model for how a single layer of endodermis is formed in *A. thaliana* is that once SHR turns on the expression of SCR in the endodermis, SCR physically interacts with SHR and sequesters SHR in the nuclei of endodermal cells, preventing further movement into the cortex cell file (Fig. 1) (4). In addition to SCR, the JACKDAW (JKD) and MAGPIE (MGP) transcription factors may also play a role in limiting SHR movement, again through direct binding to the SHR protein (9). Because, outside of

## Significance

**In nature, nearly all plants have only a single layer of endodermis. The number of cortex cell layers often varies between species and between roots on the same plant. Here we show that the expression of conserved SHORT-ROOT (SHR) protein, in the context of the root of *Arabidopsis thaliana*, is responsible for determining the number of cortex cell layers and that the number of cell layers is a function of the extent of SHR movement. These results provide a plausible model for regulating the number of cortex cell layers in plant roots that relies upon controlled intercellular movement of the SHR transcription factor.**

Author contributions: S.W., C.-M.L., C.P., and K.L.G. designed research; S.W., C.-M.L., T.H., S.P., F.D., S.H., G.P., C.P., and K.L.G. performed research; S.W., C.-M.L., S.P., C.P., and K.L.G. analyzed data; and S.W., C.-M.L., and K.L.G. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

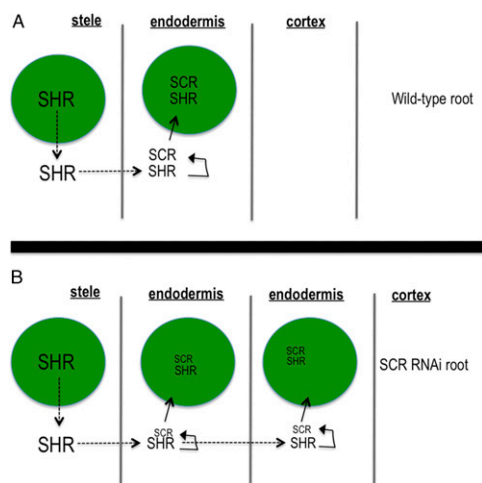
This article is a PNAS Direct Submission. G.V.R. is a guest editor invited by the Editorial Board.

<sup>1</sup>Present address: Department of Biomedical Sciences, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA 19107.

<sup>2</sup>To whom correspondence should be addressed. Email: gallagkl@sas.upenn.edu.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1407371111/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1407371111/-DCSupplemental).





**Fig. 1.** Cartoon summarizing the prevailing model for ground tissue patterning proposed by Cui et al. (4). The green circles are nuclei. Dotted lines indicate protein movement. The size of the font is meant to indicate the amount of the protein. (A) The pathway for the formation of a normal root and (B) one in which SCR is reduced via RNAi.

the stele, SHR is thought to be both necessary and sufficient for endodermal cell specification, the physical interaction between SHR and SCR prevents the formation of additional endodermal cell layers by limiting SHR movement. This model is supported by the finding that the domain of SHR movement is increased in SCR knockdown lines (SCR RNAi; Fig. 1) and that increases in the extent of SHR movement lead to the formation of additional SCR-expressing cell layers, with SCR expression being used as a marker of endodermis (4). Also in support of this model is the finding that ectopic expression of SHR can cause cells to produce suberin, a waxy substance produced by the endodermis. Although JKD and MGP also affect the movement of SHR, they appear to affect the position of the endodermis but not the number of endodermal cell layers (9).

Because all plants have a single layer of endodermis in the mature root, and most plants contain homologs of both SHR and SCR, Cui et al. (4) tested whether the physical interaction between SHR and SCR is conserved in rice. They found that OsSHR1 interacted with both OsSCR1 and AtSCR in yeast. Based upon these findings, they proposed an elegant model in which the interaction between SHR and SCR represents an evolutionarily conserved mechanism that delimits SHR movement and thereby defines a single layer of endodermis (4). Although this mechanism for the specification of a single endodermis is often cited in the literature, the hypothesis has not been fully tested. In addition, this model provides no mechanism for the formation of extra cortex cell layers in roots like those of rice.

Here, using the SHR protein from *A. thaliana* and the homologous SHR proteins from two species of grasses, *Brachypodium distachyon* and *Oryza sativa*, we examined the function of SHR in the root of *A. thaliana*. All of the SHR homologs were able to move out of the stele into the ground tissue. The movement of the SHR proteins was dependent upon plasmodesmata (intercellular channels that connect plant cells) and conserved sequences within the GRAS domain of the SHR proteins. Interestingly, we found that although all of the SHR homologs interacted strongly with AtSCR (as well as AtMGP and AtJKD), their movement was not limited to a single layer of ground tissue, indicating that physical association between SHR and SCR is insufficient to restrict SHR movement within the endodermis. In addition, although all of the SHR proteins had the ability to restore endodermal specification in the *shr-2* mutants, none of them (including AtSHR) had the ability to specify more than one layer of functional endodermis.

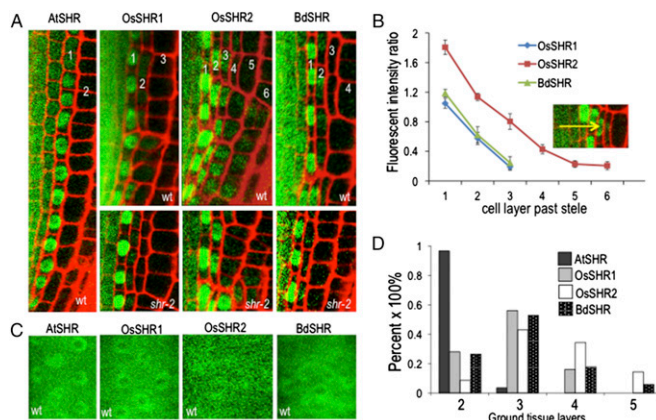
Instead, all extra cell layers produced by the expression of the SHR proteins adopted cortex cell characteristics. In contrast with previous findings (4), our results show that the ability of SHR to specify endodermis is spatially limited to the cell layer immediately outside of the stele. Therefore, our data significantly revise the previous established model for the regulation of ground tissue patterning (Fig. 1) and suggest a credible mechanism by which the regulated movement of SHR controls the number of cortex cell layers produced in roots of different species.

## Results

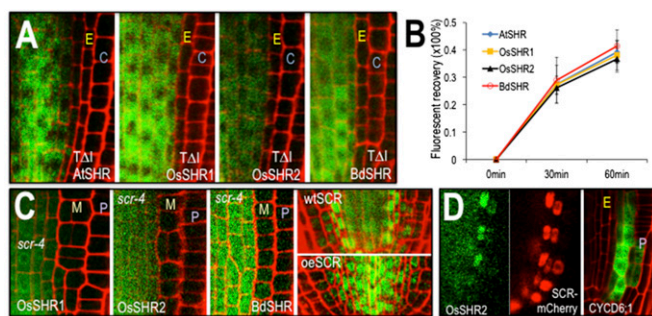
### The SHR Homologs Are Mobile and Move Beyond the Endodermis.

Although a single endodermis seems to be the rule in normal root development, multiple layers of cortex are common in many plant species, including rice and *B. distachyon* (Fig. S1) (2, 3). When expressed as a YFP fusion under the *AtSHR* promoter in either wild-type or in *shr-2* mutant roots, OsSHR1 (LOC\_Os7g39820), OsSHR2 (LOC\_Os3g31880), and BdSHR (LOC100830802) were detected as YFP fusions in multiple cell layers beyond the stele forming a protein gradient with the highest levels directly outside of the stele (Fig. 2A and B). These results indicate that all of the SHR proteins are mobile. Similar to AtSHR, the YFP-tagged SHR homologs all showed both nuclear and cytoplasmic localization in the stele (Fig. 2A and C); outside of the stele the protein localization was restricted to the nucleus (Fig. 2A), indicating that similar mechanisms control the subcellular localization of the *A. thaliana* and the grass SHR proteins.

To determine whether the mechanisms promoting the intercellular movement of OsSHR1, OsSHR2, BdSHR, and AtSHR are similar, we examined the role of a conserved threonine (T289) in protein transport. In AtSHR, mutation of T289 to alanine (A), in the VHIID domain of the protein, inhibits nuclear localization and intercellular movement of AtSHR (4). We converted the conserved threonine to alanine in OsSHR1, OsSHR2, and BdSHR and found that as in AtSHR, the conserved threonine is required for nuclear localization and movement of all three of the SHR homologs



**Fig. 2.** The monocot SHR proteins move beyond the endodermis in *A. thaliana* roots. (A) Confocal images of the SHR homologs expressed as YFP fusions under the *SHR* promoter in both wild-type (A, as labeled, B–D) and in *shr-2* (A, as labeled) roots. The numbers represent the ground tissue layers relative to the stele, which are quantified in D. (B) The SHR homologs as YFP fusions formed a protein gradient, with the highest levels in the cell layer directly outside of the stele. The *Inset* is a representative image from OsSHR2-YFP, and the arrow shows the direction of the gradient. The relative fluorescence intensity was quantified using the fluorescence intensity of each ground tissue layer against that in stele ( $n = 8$  roots, 96 cells for each SHR homolog). (C) Confocal image showing the YFP-tagged SHR homologs localized to both the nucleus and cytoplasm of stele cell. (D) Quantification of additional ground tissue layers caused by the expression of SHR homologs ( $n = 3$  replicates, 36 roots for each SHR homolog).



**Fig. 3.** The SHR proteins have similar requirements for localization and movement. (A) Mutation of a conserved threonine (residue 289 in AtSHR, 345 in OsSHR1, 352 in OsSHR2, and 354 in BdSHR) in the VHIID domains of the SHR proteins inhibits nuclear localization and intercellular movement. C, cortex; E, endodermis. Full root tip images are in Fig. S2. (B) Quantification of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) showed that the kinetics of protein movement between the stele and the first ground tissue is comparable among all SHR homologs [ $n = 3$  replicates, 9 roots and 35–132 cells for each SHR homolog; assays were done in wild type (WT)]. (C) The *scr-4* mutation is epistatic to the effects of expression of the SHR homologs. M, mutant cell layer; P, epidermis. The first three panels show transgene expression from the SHR promoter in the *scr-4* (null) background. The last two panels show OsSHR2-YFP in a WT root and a root overexpressing (oe) AtSCR-mTFF from the SHR promoter. (D) Expression of OsSHR2 from the SHR promoter (Left and Middle) drives expression of the SCR:mCherry marker and expression of CYCD6;1:erGFP (Right), which is visualized without the OsSHR2-YFP signal.

(Fig. 3A and Fig. S2). To determine whether the kinetics of protein movement are similar for the SHR proteins, we measured the fluorescent recovery of the BdSHR-YFP, OsSHR1-YFP, and OsSHR2-YFP proteins after photobleaching of the YFP signal in the inner ground tissue layers. The kinetics of recovery were similar for all of the SHR proteins (Fig. 3B and Fig. S3), indicating that these proteins traffic by a similar, if not the same, pathway.

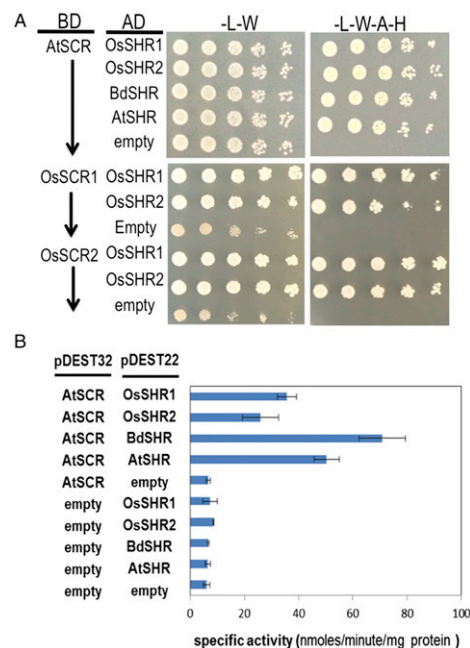
Previously, we showed that the intercellular movement of AtSHR occurs via plasmodesmata (PD) (10). PD-dependent movement of AtSHR was demonstrated using a semidominant inducible allele of callose synthase (*icals3m*) that deposits callose around the PD in response to estradiol treatment. The accumulation of callose around the PD decreases the PD aperture and movement of the SHR protein from the stele into the endodermis. Induction of the *icals3m* transgene (expressed in the stele from the WOODENLEG promoter) reliably blocked movement of the OsSHR1 and OsSHR2 proteins from the stele into the ground tissue layers (Fig. S4). Collectively, these results indicate a conserved mechanism for intercellular protein movement among the different SHR homologs.

**SHR Homologs Interact With SCR, MGP, and JKD Proteins and Rely on SCR Expression for Movement and Function.** In *A. thaliana*, generation of extra ground tissue layers by ectopic expression of AtSHR is dependent upon SCR. In the absence of SCR, extra cell layers do not form (7). To test whether the phenotype generated by expression of the SHR homologs in *A. thaliana* is also dependent upon SCR, we crossed the transgenic lines expressing BdSHR-YFP, OsSHR1-YFP, and OsSHR2-YFP into a *scr-4* (null) mutant background. In all cases, the *scr-4* mutation was largely epistatic to the effects of the expression of the SHR homologs on root patterning (Fig. 3C). Expression of BdSHR and OsSHR1 in *scr-4* marginally decreased the time until middle cortex formation (from day 7 to day 4), which normally forms precociously in *scr-4* mutants (11); however, there were no other changes in the *scr-4* phenotype. Interestingly, nuclear localization and movement of BdSHR-YFP, OsSHR1-YFP, and OsSHR2-YFP appeared decreased in the *scr-4* background, which is similar

to what we previously reported for AtSHR movement (12, 13), indicating a similar mechanism for the nuclear localization and intercellular movement of the SHR proteins.

The heart of the SCR-SHR sequestration model is that interaction between SCR and SHR in the presumptive endodermis limits SHR movement and this restricts the root to a single layer of endodermis (Fig. 1) (4). Because BdSHR, OsSHR1 and OsSHR2 all moved beyond the endodermis and their movement and localization is dependent upon SCR, we tested whether these homologs could directly interact with AtSCR using yeast two-hybrid and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays. Based upon yeast growth assays, all of the SHR homologs interacted with AtSCR, as well as with MGP and JKD, which have been shown to interact with AtSHR (Fig. 4A and Fig. S5) (9). Based upon their growth on selective media, all of the homologs showed similar levels of interaction with AtSCR as did AtSHR. Quantitative BiFC (Fig. S5), as measured in *A. thaliana* protoplast, showed no significant difference in interaction between any of the SHR proteins and AtSCR. In yeast, using normalized levels of beta-galactosidase activity, of all of the SHR proteins (including AtSHR), BdSHR showed the strongest interaction with AtSCR (Fig. 4B). These results show that the increased movement of BdSHR, OsSHR1, or OsSHR2 compared with AtSHR cannot be explained simply by an inability to interact with AtSCR, nor do the strengths of interactions with AtSCR correlate with the extent of movement. Because rice has two SCR proteins, OsSCR1 and OsSCR2, we tested for interaction between the OsSHR proteins with OsSCR. As shown in Fig. 4, both OsSHR1 and OsSHR2 interacted with OsSCR1 and OsSCR2.

To test further the role of AtSCR in the localization and movement of the monocot SHR proteins, we examined the



**Fig. 4.** The SHR homologs interact with SCR. (A) Fivefold serial dilutions of diploid yeast expressing AtSCR, OsSCR1, or OsSCR2 as bait with the SHR prey proteins (as labeled) grown on selective medium. Medium lacking adenine and histidine was used to select for interaction between the bait and prey proteins. AD, activation domain vector (prey); BD, binding domain vector (bait). BiFC results are shown in Fig. S5A. (B) Quantitative beta-galactosidase assays showing the specific activity of the beta-galactosidase enzyme induced by the interaction of the bait and prey proteins. The interacting proteins are as labeled. Assays were done in diploid yeast and normalized to total protein.



localization and movement of OsSHR2 in roots that ectopically express AtSCR from the SHR promoter (Fig. 3C). As previously reported, expression of SCR-TFP in the stele (from the AtSHR promoter) results in the nuclear localization of AtSHR-GFP in the stele; the AtSHR-GFP does not move out of the stele, and the endodermis is not formed. When SHR:SCR-TFP was crossed into plants expressing OsSHR2, there was a dramatic increase in the nuclear localization of OsSHR2 in stele cells. However, there were no effects on the movement of OsSHR2 out of the stele or on the production of ground tissue layers. These results indicate the AtSCR promotes the nuclear localization of OsSHR protein but cannot block its movement.

**The SHR Homolog Can Partially Substitute for AtSHR.** The roots of *shr-2* mutants are significantly shorter than wild type; they have a smaller meristem (based both upon the length of the meristem and cell number) and lack an endodermis. To determine whether the monocot SHR proteins could substitute for AtSHR, OsSHR1, OsSHR2, or BdSHR was crossed into the *shr-2* mutant background and both root growth and patterning were assessed (Fig. S6). Expression of either OsSHR1 or BdSHR in *shr-2* was able to fully rescue root growth and meristem size; OsSHR2 provided a partial rescue of the *shr-2* phenotype with restoration of root growth to nearly wild-type levels (Fig. S6D) and a 48.6% rescue in the size of the meristem (Fig. S6E). Although the monocot SHR proteins were able to restore growth of *shr-2* roots, all of the SHR homologs produced an “over-rescue” phenotype with the formation of multiple ground tissue layers (Fig. 2A). These results indicate that in most cases, the SHR homologs can functionally substitute for AtSHR.

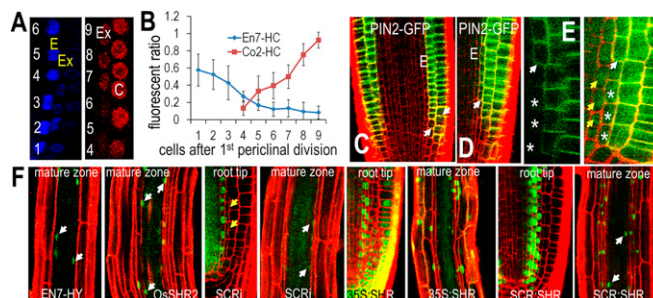
In both wild-type and *shr-2* mutants, expression of the homologous SHR transgenes in *A. thaliana* resulted in the formation of additional ground tissue layers with OsSHR2 showing the greatest potential for inducing extra cell layers (Fig. 2A and D and Fig. S1C–F). In wild-type *A. thaliana* roots, movement of SHR into the cortical endodermal initial (CEI) and the CED cell up-regulates SCR, which, together with SHR, turns on *CYCLIND6;1* (*CYCD6;1*) (8). In the CED cells, expression of *CYCD6;1* triggers the asymmetric periclinal cell division that creates the separate endodermal and cortical cell layers. Consistent with an induction of periclinal cell divisions in the generation of extra cell layers in the roots expressing the rice and *B. distachyon* SHRs, SCR is expressed beyond the endodermis (Fig. 3D) and *CYCD6;1* is expressed not only in the CEI and the CED cells but also in the cortical cell lineages. In 6-d-old roots, expression of *CYCD6;1* was particularly enriched in the outer cortex cell layers. Occasionally, expression was also seen in the epidermis (2 out of 10 roots) and the endodermis (1 out of 10 roots) (Fig. S7) (8, 12, 14, 15). These results are consistent with the ectopic movement of the OsSHR1, OsSHR2, and BdSHR proteins inducing SCR and *CYCD6;1*, which leads to ectopic periclinal cell divisions in the cortex.

**The Monocot SHRs Specify a Single Layer of Endodermis and Multiple Layers of Cortex.** To determine the identity of the additional cell layers created by the expression of OsSHR1, OsSHR2, or BdSHR, we examined cell-type specific markers of the endodermis (ENDODERMIS7:Histone2B:mCherry, referred to here as EN7-HC) and cortex (CORTEX2:Histone2B:mCherry, referred to here as pCO2-HC) (16) in wild-type roots expressing the monocot SHR proteins. We found an inverse correlation between expression of the EN7-HC and the CO2-HC markers, with cells near the root tip transiently expressing EN7-HC and cells in the distal region of the meristem expressing CO2-HC (Fig. 5A and Fig. S8A–F). To better understand the determination of cell fate within the extra ground tissues, we quantified the fluorescence intensity of the EN7-HC and CO2-HC makers in the first extra cell layer and the results were normalized to the endodermis or the cortex. We found that in the

first additional cell layer, EN7-HC expression was highest adjacent to the quiescent center (QC) and then decreased dramatically in the shootward direction (Fig. 5B). The level of EN7-HC was reduced by 80% in cells separated from the CEI by four rounds of anticlinal (transit amplifying) cell divisions. In this region of the root where EN7-HC levels dropped, CO2-HC expression was initiated (Fig. 5B). The intensity of CO2-HC within the first extra cell layer increased sevenfold after an additional five rounds of anticlinal cell division, indicating that the additional ground tissue layers that are not in direct contact with the stele transiently express EN7-HC, but then quickly adopt a cortex cell identity as they are displaced into the distal meristem (shootward) via transit amplifying cell divisions.

To further verify the identity of the extra ground tissues layers, we crossed a functional marker of cell identity, the PIN2:PIN2-GFP (PIN-FORMED 2) auxin efflux carrier into a line expressing OsSHR2. In wild-type *A. thaliana* roots, PIN2 is absent from the endodermis and is expressed in the cortex and the epidermis (Fig. 5C). In the epidermis, PIN2 localizes to the basal region (the shootward side) of cells, while it is restricted to the apical end (rootward side) of cells in the cortex (17). In roots expressing OsSHR2, which had the most dramatic effect on root patterning, the additional cell layers all expressed rootward-localized PIN2 (Fig. 5D and E); this is similar to the region of the root meristem in which expression of pCO2-HC was initiated. These results indicate that the ectopic cell layers generated by the expression and movement of the monocot SHRs adopt a cortex cell fate rather than an endodermal or an epidermal cell fate.

One of the distinguishing features of the endodermis is the formation of lignin-rich Casparian strips that encircle each cell in the layer. In the *A. thaliana* root, the endodermis is the only cell layer to form Casparian strips (i.e., there is no exodermis), so in wild-type roots, there is a single layer of lignified cells that surrounds the stele. In the roots expressing the monocot SHR proteins, we also detected a single lignified cell layer surrounding the



**Fig. 5.** The extra ground tissue cell layers induced by the SHR homologs have a cortical cell identity. (A) Representative images of expression of EN7-HC (pseudocolored in blue) and CO2-HC (in red) that is quantified in B. C, cortex; E, endodermis; Ex, the extra cell layer that was measured in the calculation of the fluorescence ratio shown in B. The numbers show the location of cells relative to the first divided initial cell at root tip. (B) Quantification of the fluorescence ratio between Ex and E or Ex and C as labeled ( $n = 8$  roots, 41–68 cells for each marker). CO2-HC, pCO2-H2B-mCherry; EN7-HC, pEN7-H2B-mCherry. (C) PIN2:PIN2-GFP expression in wild type. PI staining (red) was used to visualize cell boundaries. The arrows point to the cortex cells that start to express PIN2-GFP. E, endodermis. (D) PIN2:PIN2-GFP in roots expressing OsSHR2. Cell layers were shown by PI staining in red. The arrow points to the additional cell layer that starts to express PIN2-GFP. (E) Magnified images of the meristem expressing PIN2:PIN2-GFP in OsSHR2-expressing roots. Left shows just PIN-GFP; whereas Right also shows OsSHR2-YFP. The white arrows point to cells that first start to express PIN2-GFP. Yellow arrows point to the nuclear localization of OsSHR2 in the presumptive endodermis. The asterisks mark the same cells in Left and Right. (F) PI is excluded from the stele and a single ground tissue layer (the endodermis) in all genotypes (as labeled). The white arrows point to nuclei in the endodermis.





proteins, we propose a modified model for the regulation of SHR movement, in which SCR directly promotes the nuclear localization of AtSHR (along with the SHR homologs) and indirectly blocks movement through the up-regulation of an unidentified factor, indicated by “?” in Fig. 6, that inhibits movement of AtSHR from the endodermis. This revised model is based upon several lines of evidence. First, all of the SHR homologs can bind to AtSCR and all of the SHR homologs are nuclear localized in the ground tissue, yet they move beyond the endodermis in both *shr-2* and in wild-type roots. These results indicate that neither nuclear localization of SHR in the ground tissue nor binding of SHR to SCR is sufficient to block intercellular movement. In addition, previous results showed that the inclusion of a nuclear export signal in AtSHR-GFP caused cytoplasmic localization of AtSHR-GFP in the endodermis, yet the protein was restricted to the endodermis, presumably due to the presence of an SCR-dependent factor that prevents movement of AtSHR, independent of nuclear localization (21). Likewise, Sena et al. showed that when expressed in the epidermis of wild-type roots (where SCR is not normally expressed), AtSHR showed little movement into the cortex; however in the *scr* mutant background, AtSHR moved freely into the cortex (20). All of these data point to the presence of a SCR-dependent factor that restricts movement of AtSHR (but not OsSHR1, OsSHR2, or BdSHR) in the endodermis. This is in contrast to the original model in which the direct binding of AtSHR by SCR resulted in the nuclear localization of AtSHR, resulting in restricted movement (4).

A conserved mechanism limiting the movement of SHR is used to explain the formation of one endodermal cell layer in plant roots (Fig. 1) (4). This hypothesis was based, in part, upon previous data showing that ectopic expression of AtSHR can change the properties of the cell wall and induce production of suberin, which was used as a marker of endodermis. For example, in Nakajima et al. (7), expression of SHR from the SCR promoter caused the formation of supernumerary ground tissue layers that produced suberin. Recently, work by Naseer et al. has questioned the usefulness of suberin as a marker of endodermis; instead, they have shown that a functional endodermis is lignified

and able to exclude PI in the absence of suberin (18). Here we show, using the EN7-HC, CO<sub>2</sub>-HC, and PIN2-GFP markers (14, 16), as well as lignin autofluorescence and PI exclusion assays, that the expression of the SHR homologs in *A. thaliana* roots results in the formation of a single endodermal cell layer and multiple layers of cortex. In addition, reexamination of the lines that show either ectopic movement or ectopic expression of AtSHR indicates that AtSHR also has a limited ability to specify functional endodermis, even with the production of suberin.

All of our data are consistent with the SHR proteins having a spatially restricted ability to specify endodermis that is independent of the extent of protein movement. Because it is the SHR-containing ground tissue layer in contact with the stele that develops as endodermis, it may be a stele-derived signal that participates with SHR to induce endodermal specification. It is this signal that is the critical factor in the formation of a single endodermal cell layer next to the stele. In the context of the monocot roots, the spatial restriction of the stele-derived signal in the presence of increased movement of SHR represents a plausible and testable mechanism for the formation of multiple layers of cortex without an expansion of the endodermis. In this context, the regulation of the extent of SHR movement would control the number cortex cell layers, which in rice and *B. distachyon* differs between root segments on the same plant.

## Materials and Methods

All plants were grown on 1% agar plates with 0.5x Murashige and Skoog (MS) medium under a 16-h light/8-h dark cycle at 23 °C. Five- to six-day-old plants were used for all experiments unless otherwise stated. Roots were counterstained in 0.01 µg/mL PI in water. Confocal images were obtained using a 20x water-immersion lens on a Leica TCS SL microscope. The yeast two-hybrid assays were tested in diploid yeast cells by mating the two yeast strains, Y187 and AH109. BiFC assays were performed in protoplasts extracted from *A. thaliana*. Details are provided in *SI Materials and Methods*.

**ACKNOWLEDGMENTS.** J. Ugochukwu and C. Heyworth provided technical support. D. Wagner provided comments on the manuscript. A. Stout manages the confocal facility. S.W. and C.-M.L. are partially supported by National Science Foundation Grant 1243945 awarded to K.L.G.

- Dolan L, et al. (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119(1):71–84.
- Clark LH, Harris WH (1981) Observations on the root anatomy of rice (*Oryza-Sativa*-L). *Am J Bot* 68(2):154–161.
- Watt M, Schneebeli K, Dong P, Wilson IW (2009) The shoot and root growth of *Brachypodium* and its potential as a model for wheat and other cereal crops. *Funct Plant Biol* 36(11):960–969.
- Cui H, et al. (2007) An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science* 316(5823):421–425.
- Gallagher KL, Paquette AJ, Nakajima K, Benfey PN (2004) Mechanisms regulating SHORT-ROOT intercellular movement. *Curr Biol* 14(20):1847–1851.
- Helariutta Y, et al. (2000) The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101(5):555–567.
- Nakajima K, Sena G, Naway T, Benfey PN (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413(6853):307–311.
- Sozzani R, et al. (2010) Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* 466(7302):128–132.
- Welch D, et al. (2007) *Arabidopsis* JACKDAW and MAGPIE zinc finger proteins delimit asymmetric cell division and stabilize tissue boundaries by restricting SHORT-ROOT action. *Genes Dev* 21(17):2196–2204.
- Vatén A, et al. (2011) Callose biosynthesis regulates symplastic trafficking during root development. *Dev Cell* 21(6):1144–1155.
- Paquette AJ, Benfey PN (2005) Maturation of the ground tissue of the root is regulated by gibberellin and SCARECROW and requires SHORT-ROOT. *Plant Physiol* 138(2): 636–640.
- Koizumi K, Hayashi T, Gallagher KL (2012) SCARECROW reinforces SHORT-ROOT signaling and inhibits periclinal cell divisions in the ground tissue by maintaining SHR at high levels in the endodermis. *Plant Signal Behav* 7(12):1573–1577.
- Koizumi K, Wu S, MacRae-Crerar A, Gallagher KL (2011) An essential protein that interacts with endosomes and promotes movement of the SHORT-ROOT transcription factor. *Curr Biol* 21(18):1559–1564.
- Koizumi K, Gallagher KL (2012) Identification of SHRUBBY, a SHORT-ROOT and SCARECROW interacting protein that controls root growth and patterning. *Development* 140(12):1292–1300.
- Koizumi K, Hayashi T, Wu S, Gallagher KL (2012) The SHORT-ROOT protein acts as a mobile, dose-dependent signal in patterning the ground tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(32):13010–13015.
- Heidstra R, Welch D, Scheres B (2004) Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect *Arabidopsis* SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes Dev* 18(16):1964–1969.
- Blilou I, et al. (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433(7021):39–44.
- Naseer S, et al. (2012) Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(25):10101–10106.
- Geldner N (2013) The endodermis. *Annu Rev Plant Biol* 64:531–558.
- Sena G, Jung JW, Benfey PN (2004) A broad competence to respond to SHORT ROOT revealed by tissue-specific ectopic expression. *Development* 131(12):2817–2826.
- Gallagher KL, Benfey PN (2009) Both the conserved GRAS domain and nuclear localization are required for SHORT-ROOT movement. *Plant J* 57(5):785–797.



# **Bibliographie**



- Atta, R., L. Laurens, et al. (2009). "Pluripotency of Arabidopsis xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro." The Plant Journal **57**(4): 626-644.
- Baluška, F. (1995). Structure and Function of Roots Proceedings of the Fourth International Symposium on Structure and Function of Roots, June 20–26, 1993, Stará Lesná, Slovakia. Dordrecht, Springer Netherlands.
- Baluška, F., R. W. Brailsford, et al. (1993). "Cellular Dimorphism in the Maize Root Cortex: Involvement of Microtubules, Ethylene and Gibberellin in the Differentiation of Cellular Behaviour in Postmitotic Growth Zones." Botanica Acta **106**(5): 394-403.
- Bargmann, B. O., A. Marshall-Colon, et al. (2013). "TARGET: a transient transformation system for genome-wide transcription factor target discovery." Mol Plant **6**(3): 978-980.
- Baum, S. F., J. G. Dubrovsky, et al. (2002). "Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in Arabidopsis thaliana (Brassicaceae) roots." Am J Bot **89**(6): 908-920.
- Benfey, P. N., P. J. Linstead, et al. (1993). "Root development in Arabidopsis: four mutants with dramatically altered root morphogenesis." Development **119**(1): 57-70.
- Betts, M. J. and R. B. Russell (2003). Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions. Bioinformatics for Geneticists, John Wiley & Sons, Ltd: 289-316.
- Bolle, C. (2004). "The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development." Planta **218**(5): 683-692.
- Bouranis, D. L., S. N. Chorianopoulou, et al. (2003). "Aerenchyma formation in roots of maize during sulphate starvation." Planta **217**(3): 382-391.
- Brundett, M. C., D. E. Enstone, et al. (1988). "A Berberine-Aniline Blue Fluorescent Staining Procedure for Suberin, Lignin, and Callose in Plant Tissue." Protoplasma **146**: 133-142.
- Cai, X., T. Chen, et al. (2011). "Development of casparian strip in rice cultivars." Plant Signaling & Behavior **6**(1): 59-65.
- Cai, Y., S. V. Fedeles, et al. (2014). "Altered trafficking and stability of polycystins underlie polycystic kidney disease." J Clin Invest **124**(12): 5129-5144.
- Carlsbecker, A., J. Y. Lee, et al. (2010). "Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate." Nature **465**(7296): 316-321.
- Cassman, Ed. (1993). Breaking the yield barrier.
- Celenza, J. L., Jr., P. L. Grisafi, et al. (1995). "A pathway for lateral root formation in Arabidopsis thaliana." Genes Dev **9**(17): 2131-2142.
- Che, P., S. Lall, et al. (2006). "Gene expression programs during shoot, root, and callus development in Arabidopsis tissue culture." Plant Physiol **141**(2): 620-637.
- Chupeau, M.-C., F. Granier, et al. (2013). "Characterization of the Early Events Leading to Totipotency in an Arabidopsis Protoplast Liquid Culture by Temporal Transcript Profiling." The Plant Cell **25**(7): 2444-2463.
- Clark, L. H. and W. H. Harris (1981). "Observations on the Root Anatomy of Rice (Oryza sativa L.)." American Journal of Botany **68**(2): 154-161.
- Clough, S. J. and A. F. Bent (1998). "Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana." The Plant Journal **16**(6): 735-743.
- Clowes, F. A. L. (1958). "DEVELOPMENT OF QUIESCENT CENTRES IN ROOT MERISTEMS." New Phytologist **57**(1): 85-88.

- Clowes, F. A. L. (1978). "Origin Of The Quiescent Centre In Zea Mais." New Phytologist **80**(2): 409-419.
- Clowes, F. A. L. (1984). "Size and activity of quiescent centres of roots." New Phytologist **96**(1): 13-21.
- Coudert, Y., C. Perin, et al. (2010). "Genetic control of root development in rice, the model cereal." Trends Plant Sci **15**(4): 219-226.
- Courtois, B. (2007). "Une brève histoire de l'amélioration génétique du riz."
- Cui, H. (2015). "Cortex proliferation in the root is a protective mechanism against abiotic stress." Plant Signaling & Behavior **10**(5): e1011949.
- Cui, H., M. P. Levesque, et al. (2007). "An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants." Science **316**(5823): 421-425.
- Dhondt, S., F. Coppens, et al. (2010). "SHORT-ROOT and SCARECROW Regulate Leaf Growth in Arabidopsis by Stimulating S-Phase Progression of the Cell Cycle." Plant Physiology **154**(3): 1183-1195.
- Di Laurenzio, L., J. Wysocka-Diller, et al. (1996). "The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root." Cell **86**(3): 423-433.
- Dolan, L., K. Janmaat, et al. (1993). "Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root." Development **119**(1): 71-84.
- Drew, M. C., C.-J. He, et al. (1989). "Decreased Ethylene Biosynthesis, and Induction of Aerenchyma, by Nitrogen- or Phosphate-Starvation in Adventitious Roots of Zea mays L." Plant Physiology **91**(1): 266-271.
- Esser, K. (1997). Progress in Botany.
- Evert, R. F. and K. Esau (2006). Esau's Plant anatomy : meristems, cells, and tissues of the plant body : their structure, function, and development. Hoboken, N.J., Wiley-Interscience.
- F. Baluška, D. V., P.W. Barlow (2001). "A polarity crossroad in the transition growth zone of maize root apices: Cytoskeletal and developmental implications." Journal Plant Growth Regulation **20**: 170–181.
- Fan, M., J. Zhu, et al. (2003). "Physiological roles for aerenchyma in phosphorus-stressed roots." Functional Plant Biology **30**(5): 493-506.
- Fariselli, P., P. L. Martelli, et al. (2015). "INPS: Predicting the Impact of Non-Synonymous Variations on Protein Stability from Sequence." Bioinformatics.
- Feng, Z., Y. Mao, et al. (2014). "Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **111**(12): 4632-4637.
- Freshour, G., Clay, R.P., Fuller, M.S, Albersheim, P., Darvill, A.G., Hahn, M.G (1996). "Developmental and tissue-specific structural alterations of the cell wall polysaccharides of Arabidopsis thaliana roots." Plant Physiol **110**: 1413-1429.
- Gabaldon, T. and E. V. Koonin (2013). "Functional and evolutionary implications of gene orthology." Nat Rev Genet **14**(5): 360-366.
- Gallagher, K. L. and P. N. Benfey (2009). "Both the conserved GRAS domain and nuclear localization are required for SHORT-ROOT movement." Plant J **57**(5): 785-797.
- Gallagher, K. L., A. J. Paquette, et al. (2004). "Mechanisms regulating SHORT-ROOT intercellular movement." Curr Biol **14**(20): 1847-1851.

- Gao, X., C. Wang, et al. (2014). "Identification of bundle sheath cell fate factors provides new tools for C3-to-C4 engineering." Plant Signaling & Behavior **9**: e29162.
- Geldner, N. (2013). "The endodermis." Annu Rev Plant Biol **64**: 531-558.
- Gilbert, L. A., M. H. Larson, et al. (2013). "CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes." Cell **154**(2): 442-451.
- Gonzalez, D. H. (2016). Chapter 1 - Introduction to Transcription Factor Structure and Function. Plant Transcription Factors. D. H. Gonzalez. Boston, Academic Press: 3-11.
- Gregory, P. J. (2006). Plant roots : growth, activity, and interaction with soils. Oxford ; Ames, Iowa, Blackwell Pub.
- Hamilton, A. J. and D. C. Baulcombe (1999). "A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants." Science **286**(5441): 950-952.
- Heidstra, R., D. Welch, et al. (2004). "Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect Arabidopsis SCARECROW action in asymmetric cell division." Genes Dev **18**(16): 1964-1969.
- Helariutta, Y., H. Fukaki, et al. (2000). "The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling." Cell **101**(5): 555-567.
- Henry S, D. F., Bettembourg M, Bureau C, Guiderdoni E, Périn C, Diévar A (2016). "Two cortex subdomains are present in rice roots." Frontiers in Plant Science. **6**: 1139.
- Hirsch, S., J. Kim, et al. (2009). "GRAS Proteins Form a DNA Binding Complex to Induce Gene Expression during Nodulation Signaling in Medicago truncatula." The Plant Cell **21**(2): 545-557.
- Jacquemin, J., D. Bhatia, et al. (2013). "The International Oryza Map Alignment Project: development of a genus-wide comparative genomics platform to help solve the 9 billion-people question." Current Opinion in Plant Biology **16**(2): 147-156.
- Jia, Y., H. Tian, et al. (2015). "The Arabidopsis thaliana elongator complex subunit 2 epigenetically affects root development." Journal of Experimental Botany.
- Jin, H. and C. Martin (1999). "Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family." Plant Molecular Biology **41**(5): 577-585.
- Jinek, M., K. Chylinski, et al. (2012). "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity." Science **337**(6096): 816-821.
- Jones, B. (2011). Identification, isolation, expression analysis and molecular characterization of nine genes key to late embryogenesis in loblolly pine. Georgia Institute of Technology. athens.
- Jung, J. K. H. and S. R. McCouch (2013). "Getting to the roots of it: Genetic and hormonal control of root architecture." Frontiers in Plant Science **4**.
- Kamiya, N., H. Nagasaki, et al. (2003). "Isolation and characterization of a rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem." Plant J **35**(4): 429-441.
- Kareem, A., K. Durgaprasad, et al. (2015). "PLETHORA Genes Control Regeneration by a Two-Step Mechanism." Current Biology **25**(8): 1017-1030.
- Katsiarimpa, A., K. Kalinowska, et al. (2013). "The Deubiquitinating Enzyme AMSH1 and the ESCRT-III Subunit VPS2.1 Are Required for Autophagic Degradation in Arabidopsis." The Plant Cell **25**(6): 2236-2252.
- Kawai, M., P. K. Samarajeewa, et al. (1998). "Cellular dissection of the degradation pattern of cortical cell death during aerenchyma formation of rice roots." Planta **204**(3): 277-287.



- Kawata S, S. H. (1965). "On the lateral root primordia formation in the crown roots of rice plants." Proc Crop Sci Soc Jpn **33**(426-431).
- Knox, J. P., Linstead, P.J., King, J., Cooper, C., and Roberts, K. (1990). "Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices." Planta **181**: 512-521
- Koizumi, K., T. Hayashi, et al. (2012). "SCARECROW reinforces SHORT-ROOT signaling and inhibits periclinal cell divisions in the ground tissue by maintaining SHR at high levels in the endodermis." Plant Signal Behav **7**(12): 1573-1577.
- Koizumi, K., T. Hayashi, et al. (2012). "The SHORT-ROOT protein acts as a mobile, dose-dependent signal in patterning the ground tissue." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(32): 13010-13015.
- Kono, Y., M. Igeta, et al. (1972). "Studies on the Developmental Physiology of the Lateral Roots in Rice Seminal Roots." Japanese Journal of Crop Science **41**(2): 192-204.
- Krishnan, A., E. Guiderdoni, et al. (2009). "Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses." Plant Physiol **149**(1): 165-170.
- Kuersten, S. and E. B. Goodwin (2003). "The power of the 3[prime] UTR: translational control and development." Nat Rev Genet **4**(8): 626-637.
- Langdale, J. A., B. Lane, et al. (1989). "Cell lineage analysis of maize bundle sheath and mesophyll cells." Developmental Biology **133**(1): 128-139.
- Lartaud, M., C. Perin, et al. (2014). "PHIV-RootCell: a supervised image analysis tool for rice root anatomical parameter quantification." Front Plant Sci **5**: 790.
- Lee, J.-Y., J. Colinas, et al. (2006). "Transcriptional and posttranscriptional regulation of transcription factor expression in Arabidopsis roots." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(15): 6055-6060.
- Levesque, M. P., T. Vernoux, et al. (2006). "Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in Arabidopsis." PLoS Biol **4**(5): e143.
- Liu, J., N. B. Perumal, et al. (2006). "Intrinsic disorder in transcription factors." Biochemistry **45**(22): 6873-6888.
- Long, Y., B. Scheres, et al. (2015). "The logic of communication: roles for mobile transcription factors in plants." Journal of Experimental Botany **66**(4): 1133-1144.
- Lux, A., M. Luxova, et al. (2004). "Root cortex : structural and functional variability and responses to environmental stress." Root Research **13**(3): 117-131.
- Lux, A., S. Morita, et al. (2005). "An Improved Method for Clearing and Staining Free-hand Sections and Whole-mount Samples." Annals of Botany **96**(6): 989-996.
- Mai, C., N. Phung, et al. (2014). "Genes controlling root development in rice." Rice **7**(1): 1-11.
- Marakova, S., K.H. Haft, D. Barrangou, R. Brouns, S. Charpentier, E. Horvath, P. Moineau, S. Mojica, F. Wolf, Y. Yakunin, A. van der Oost, J. Koonin. (2011). "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems." Nature Reviews. Microbiology **9** (6): 467-477.
- Miao, J., D. Guo, et al. (2013). "Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system." Cell Res **23**(10): 1233-1236.
- Nagalakshmi, U., K. Waern, et al. (2001). RNA-Seq: A Method for Comprehensive Transcriptome Analysis. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.
- Nakajima, K., G. Sena, et al. (2001). "Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning." Nature **413**(6853): 307-311.

- Nawy, T., J. Y. Lee, et al. (2005). "Transcriptional profile of the Arabidopsis root quiescent center." Plant Cell **17**(7): 1908-1925.
- Orman-Ligeza, B., B. Parizot, et al. (2013). "Post-embryonic root organogenesis in cereals: branching out from model plants." Trends Plant Sci **18**(8): 459-467.
- Pacheco-Villalobos, D. and C. S. Hardtke (2012). "Natural genetic variation of root system architecture from Arabidopsis to Brachypodium: towards adaptive value." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **367**(1595): 1552-1558.
- Pandey, S. P. and I. E. Somssich (2009). "The Role of WRKY Transcription Factors in Plant Immunity." Plant Physiology **150**(4): 1648-1655.
- Paquette, A. J. and P. N. Benfey (2005). "Maturation of the ground tissue of the root is regulated by gibberellin and SCARECROW and requires SHORT-ROOT." Plant Physiol **138**(2): 636-640.
- Pauluzzi, G., F. Divol, et al. (2012). "Surfing along the root ground tissue gene network." Dev Biol **365**(1): 14-22.
- Price, A. H., K. A. Steele, et al. (2002). "Upland rice grown in soil-filled chambers and exposed to contrasting water-deficit regimes: II. Mapping quantitative trait loci for root morphology and distribution." Field Crops Research **76**(1): 25-43.
- Pysh, L. D., J. W. Wysocka-Diller, et al. (1999). "The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes." Plant J **18**(1): 111-119.
- Quéré, C. (2014). Régulation post-transcriptionnelle du gène unc-54 de *Caenorhabditis elegans* identifiée in vivo par un système de double rapporteurs fluorescents, Université de Bordeaux.
- Rebouillat, J., A. Dievart, et al. (2009). "Molecular Genetics of Rice Root Development." Rice **2**(1): 15-34.
- Riechmann, J. L. and E. M. Meyerowitz (1998). "The AP2/EREBP family of plant transcription factors." Biol Chem **379**(6): 633-646.
- Ristova, D., U. Rosas, et al. (2013). "RootScape: A Landmark-Based System for Rapid Screening of Root Architecture in Arabidopsis." Plant Physiology **161**(3): 1086-1096.
- Rose, J. K. C. (2003). The Plant Cell Wall, Blackwell.
- S. Makarova, K., D. H. Haft, et al. (2011). "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems." Nature Reviews. Microbiology **9**(6): 467-477.
- Sena, G., J. W. Jung, et al. (2004). "A broad competence to respond to SHORT ROOT revealed by tissue-specific ectopic expression." Development **131**(12): 2817-2826.
- Shoichet, B. K., W. A. Baase, et al. (1995). "A relationship between protein stability and protein function." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**(2): 452-456.
- Silverstone, A. L., T. S. Tseng, et al. (2007). "Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in Arabidopsis." Plant Physiol **143**(2): 987-1000.
- Singhania, R., N. Khairuddin, et al. (2012). "RNA Interference for the Treatment of Papillomavirus Disease." The Open Virology Journal **6**: 204-215.
- Slewinski, T. L., A. A. Anderson, et al. (2014). "Short-root1 plays a role in the development of vascular tissue and kranz anatomy in maize leaves." Mol Plant **7**(8): 1388-1392.
- Slewinski, T. L., A. A. Anderson, et al. (2012). "Scarecrow plays a role in establishing Kranz anatomy in maize leaves." Plant Cell Physiol **53**(12): 2030-2037.

- Smith, S. and I. De Smet (2012). "Root system architecture: insights from Arabidopsis and cereal crops." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **367**(1595): 1441-1452.
- Souaze, F., A. Ntodou-Thome, et al. (1996). "Quantitative RT-PCR: limits and accuracy." Biotechniques **21**(2): 280-285.
- Sugimoto, K., Y. Jiao, et al. (2010). "Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway." Dev Cell **18**(3): 463-471.
- Tian, C., P. Wan, et al. (2004). "Genome-Wide Analysis of the GRAS Gene Family in Rice and Arabidopsis." Plant Molecular Biology **54**(4): 519-532.
- Till, B. J., J. Cooper, et al. (2007). "Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING." BMC Plant Biol **7**: 19.
- Tolivia, D. and J. Tolivia (1987). "Fasga: A new polychromatic method for simultaneous and differential staining of plant tissues." Journal of Microscopy **148**(1): 113-117.
- Tuberosa, R., M. C. Sanguineti, et al. (2002). "Identification of QTLs for root characteristics in maize grown in hydroponics and analysis of their overlap with QTLs for grain yield in the field at two water regimes." Plant Mol Biol **48**(5-6): 697-712.
- Waisel, Y., A. Eshel, et al. (2002). Plant roots : the hidden half. New York, M. Dekker.
- Wang, J., S. Andersson-Gunneras, et al. (2011). "Reduced expression of the SHORT-ROOT gene increases the rates of growth and development in hybrid poplar and Arabidopsis." PLoS One **6**(12): e28878.
- Watt, M., K. Schneebeli, et al. (2009). "The shoot and root growth of Brachypodium and its potential as a model for wheat and other cereal crops." Functional Plant Biology **36**(11): 960-969.
- Welch, D., H. Hassan, et al. (2007). "Arabidopsis JACKDAW and MAGPIE zinc finger proteins delimit asymmetric cell division and stabilize tissue boundaries by restricting SHORT-ROOT action." Genes Dev **21**(17): 2196-2204.
- Wu, S. and K. L. Gallagher (2014). "The movement of the non-cell-autonomous transcription factor, SHORT-ROOT relies on the endomembrane system." Plant J **80**(3): 396-409.
- Wu, S., C. M. Lee, et al. (2014). "A plausible mechanism, based upon Short-Root movement, for regulating the number of cortex cell layers in roots." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(45): 16184-16189.
- Wysocka-Diller, J. W., Y. Helariutta, et al. (2000). "Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot." Development **127**(3): 595-603.
- Yang, C., X. Zhang, et al. (2014). "Anatomy and Histochemistry of Roots and Shoots in Wild Rice (*Zizania latifolia* Griseb.)." Journal of Botany **2014**: 9.
- Zentella, R., Z.-L. Zhang, et al. (2007). "Global Analysis of DELLA Direct Targets in Early Gibberellin Signaling in Arabidopsis." The Plant Cell **19**(10): 3037-3057.
- Zhang, B., X. Pan, et al. (2006). "Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact." Developmental Biology **289**(1): 3-16.
- Zhang, J. J., S. Y. Wu, et al. (2015). "A detailed analysis of the leaf rolling mutant *slr2* reveals complex nature in regulation of bulliform cell development in rice (*Oryza sativa* L.)." Plant Biology **17**(2): 437-448.
- Zhang, T., X. Zhang, et al. (2011). "An efficient procedure for plant organellar genome assembly, based on whole genome data from the 454 GS FLX sequencing platform." Plant Methods **7**(1): 38.
- Zhang, W. and R. Yu (2014). "Molecule mechanism of stem cells in Arabidopsis thaliana." Pharmacognosy Reviews **8**(16): 105-112.

Zhu, J., K. M. Brown, et al. (2010). "Root cortical aerenchyma improves the drought tolerance of maize (*Zea mays* L.)." Plant Cell Environ **33**(5): 740-749.



**Titre :** Etude de la fonction de deux facteurs de transcription *SHORT-ROOT 1* et *SHORT-ROOT 2* dans la mise en place du cortex chez le riz

**Auteur :** Sophia HENRY

**Directeur de thèse :** Christophe PERIN

**RESUME DE LA THESE :**

Un développement racinaire optimal est essentiel aux plantes pour favoriser leur croissance et leur permettre d'accéder à de meilleurs rendements. La plupart de nos connaissances concernant le contrôle moléculaire du développement racinaire a été acquise grâce à l'étude de la plante modèle dicotylédone *Arabidopsis thaliana*. Les racines de riz, plante modèle des monocotylédones, présentent une anatomie semblable à celle d'*A.thaliana*. Ces deux systèmes racinaires sont caractérisés par une organisation concentrique des tissus autour de la stèle. Entre l'endoderme et l'épiderme, le riz présente deux couches plus externes, le sclérenchyme et l'exoderme, ainsi que plusieurs couches de cortex. Chacun de ces tissus possède des spécificités anatomiques et moléculaires qui leur confèrent des rôles divers dans le développement et la croissance de la racine. Le nombre de couche variable de cortex dépend du type de racines, du stade de développement de la plante et des conditions environnementales. Le tissu cortical a un rôle structurel, fonctionnel et adaptatif essentiel pour les racines de riz.

La différenciation du cortex et de l'endoderme a été longuement étudiée chez *A.thaliana* durant la dernière décennie. Le gène *SHORT-ROOT (SHR)* a été identifié comme un gène clé dans leur formation. Un modèle moléculaire a été développé, où *SHR* est transcrit dans la stèle et dont la protéine migre jusqu'à l'endoderme où elle active la transcription du gène *SCARECROW (SCR)*. Ensemble *SHR* et *SCR* induisent la division péricleinale asymétrique d'une cellule initiale à l'origine de la formation des deux tissus qui sont l'endoderme et le cortex. Chez le riz, il existe des orthologues de *SHR* et *SCR*, qui sont apparus suite à des duplications, appelés *OsSHR1* et *OsSHR2* ainsi qu'*OsSCR1* et *OsSCR2*. Au sein de cette thèse nous avons tenté d'identifier le rôle des gènes *OsSHR1&2* dans la mise en place des différentes couches de cortex chez le riz.

**Mots-clés :**

Riz, racine, cortex, développement racinaire, génétique, *SHORT-ROOT*